

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Pneumologie

Direktor: Prof. Dr. med. C. Vogelmeier

des Fachbereichs

Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Zytokinexpression zirkulierender CD3⁺ Zellen bei eosinophilen
und nicht-eosinophilen Asthmatikern**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung

des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

David Hamm

aus Rahden

Marburg, 2018

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

03.07.2018

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Frau PD Dr. Carola Seifart

1. Koreferent: Herr Prof. Dr. Holger Garn

Zusammenfassung

Zielsetzung

Asthma bronchiale ist eine der häufigsten chronischen Krankheiten weltweit. In vielen Studien konnte die große Heterogenität der Erkrankung dargestellt werden. Unter anderem konnte zuletzt phänotypisch zwischen eosinophilem und nicht-eosinophilem Asthma differenziert werden, wobei nicht-eosinophile Asthmatiker schlechter auf eine Therapie mit inhalativen Glukokortikoiden ansprechen. Eine wichtige Rolle in der Lenkung der Immunantwort wird T-Zellen zugeschrieben und es wird angenommen, dass sie für die Ausprägung der verschiedenen Phänotypen verantwortlich sind. Da die Expression bestimmter Zytokine von unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen mit der Steuerung der Immunantwort in Zusammenhang gebracht wird, ist der Ansatz dieser Studie, die Zytokinexpression aller T-Zellen auf systemischer Ebene zu untersuchen, um mögliche Zusammenhänge mit eosinophilen und nicht-eosinophilen Phänotypen aufzuzeigen. Eine weitere Erkrankung aus dem atopischen Formenkreis ist die allergische Rhinitis, auch die Zytokinexpression von Patienten mit dieser Erkrankung sollte auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede gegenüber den beiden Phänotypen hin untersucht werden. Bei schwerem Asthma und einigen Asthmasubtypen ist das mangelhafte Ansprechen der Symptomatik auf eine Therapie mit Glukokortikoiden problematisch. Es sollte daher in einem weiteren Schritt die Zytokinexpression bei den eosinophilen und nicht-eosinophilen Asthmatikern vor und nach einer Therapie mit inhalativen Glukokortikoiden verglichen werden.

Methoden

Bei den vier Kohorten, den eosinophilen Asthmatikern (n=9), den nicht-eosinophilen Asthmatikern (n=11), den allergischen Rhinitikern (n=10) und der gesunden Kontrollkohorte (n=10) erfolgte die Durchführung einer erweiterten, asthmaspezifischen Basisdiagnostik bzw. phänotypischen Charakterisierung, sowie die Isolation von peripheren CD3⁺ T-Zellen. Nach Stimulation dieser Zellen analysierten wir die Zytokinexpression der Zytokine IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 und IL-17A auf Protein- und RNA-Ebene mittels Cytometric Bead Array bzw. quantitativer Polymerase Chain Reaction (qPCR).

IL-4 wurde nur auf Proteinebene untersucht. Desweiteren wurde bei den Asthma-Kohorten nach einer 8-wöchigen Therapie mit einem inhalativen Glukokortikoid erneut die Zytokinexpression im Verlauf gemessen.

Ergebnisse

Bei Interleukin 17A und Interleukin 10 konnte eine signifikant erhöhte Expression der Zytokine bei Asthmatikern gegenüber Gesunden und allergischen Rhinitikern nachgewiesen werden. Die Interleukine 5 und 13 zeigten sich bei Asthmatikern zwar ebenfalls erhöht, es konnte allerdings keine Signifikanz erreicht werden. Signifikante Unterschiede zwischen eosinophilen und nicht-eosinophilen Asthmatikern fanden sich weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene. Bei allergischen Rhinitikern konnte gegenüber der gesunden Kontrollkohorte keine erhöhte Zytokinexpression gezeigt werden. Die Untersuchungen des Prä-Post-Vergleichs bei Ciclesonidtherapie zeigten im zeitlichen Verlauf bei IL-6 einen signifikanten Expressionsanstieg auf Proteinebene.

Schlussfolgerung

Unsere Ergebnisse konnten keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen eosinophilen und nicht-eosinophilen Asthmatikern demonstrieren. Gründe hierfür liegen zum einen in der geringen Fallzahl unserer Studienteilnehmer bei großer Heterogenität der Erkrankung und der untersuchten T-Zellsubpopulationen. Eine Differenzierung nach anderen Kriterien könnte weiterführend sein. Möglicherweise bietet die Analyse der durch Zytokine induzierten Gene eine Diskriminationsmöglichkeit zwischen unterschiedlichen Endotypen.

Wir konnten zeigen, dass die inhalative Therapie mit Ciclesonid über 8 Wochen systemisch zu einem Expressionsanstieg des proinflammatorischen Zytokins IL-6 in CD3⁺ T-Zellen führt. Die Ursachen dieses Ergebnisses bleiben spekulativ, möglicherweise ist bei verminderter lokaler Immunabwehr eine subklinische virale Affektion der behandelten Schleimhäute ursächlich, desweiteren könnte durch eine Verminderung von T_H2-Zellen vermehrt IL-6-produzierende Zellen das Zytokin exprimieren. Weitere Studien sind nötig um dieses Ergebnis zu verifizieren und zugrunde liegende Ursachen zu identifizieren.

Abstract

Background

Asthma bronchiale is one of the most common chronic diseases. For a long time, it has been considered a mainly allergy-related, T_H2 -mediated disease with bronchial eosinophilic inflammation. However, recently various studies were able to discover a subgroup of asthmatics with signs of non-eosinophilic inflammation, which responded poorly to therapeutical glucocorticoids. T-cells, which execute their function via expressed cytokines, are commonly seen as crucial in the initiation, perpetuation and regulation of the inflammatory process. It was assumed that the expression of certain cytokines leads to the manifestation of the different phenotypes. The hypothesis of this study was that based on the profile of the cytokine expression of T-cells it could be possible to distinguish between eosinophilic and non-eosinophilic phenotypes and draw further conclusions regarding the pathogenesis of the observed differences. As the role of T-cells other than $CD4^+$ in asthma bronchiale becomes apparent, this study focused on $CD3^+$ T-cells. Since allergic rhinitis is considered a T_H2 -mediated disease as well, the exploration of similarities in the cytokine expression of $CD3^+$ T-cells between allergic rhinitics and eosinophilic asthmatics was another goal. To address the problem of glucocorticoid resistance in asthmatics, the third objective of this study was to examine differences in the cytokine expression of the two phenotypes after an 8-week therapy with inhaled corticosteroids.

Methods

This study included 9 eosinophilic and 11 non-eosinophilic asthmatics, 10 patients with allergic rhinitis and 10 healthy control subjects. Apart from asthma-specific routine diagnostics, further phenotyping and an isolation of $CD3^+$ T-cells from peripheral blood was conducted. After $CD3^+$ T-cells were stimulated for 24 hours, the cytokine expression of IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 und IL-17A was evaluated on protein level via Cytometric Bead Array (CBA) and on RNA level via quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR), IL-4 was only measured on protein level.

The asthmatic patients subsequently received an inhalative corticosteroid for 8 weeks after which the cytokine expression was measured again.

Results

In the case of interleukin 17A and interleukin 10, this study found a significant increase in the cytokine expression of asthmatics compared to healthy individuals and allergic rhinitics, whereas the increase for interleukins 5 and 13 did not reach statistical significance. Between eosinophilic and non-eosinophilic asthmatics no significant differences were discovered on protein or RNA level. The analysis of the pre-post comparison under Ciclesonide therapy showed a significant increase in expression over time with IL-6, however on the RNA level this increase was not reaching a statistically significant level.

Conclusion

The results could not demonstrate significant differences in the cytokine expression of CD3⁺ T-cells between eosinophilic and non-eosinophilic phenotypes. Possible reasons are the low number of participants, great phenotypic heterogeneity in the asthmatic cohorts and only a minor share of peripheral CD3⁺ T-cells being sensitized to asthma-related inflammation. The application of other criteria could probably be more constructive. Possibly the analysis of cytokine-induced genes is a promising approach to find a classification that allows for individualized treatment meeting the therapeutical needs of patients.

Our study indicated that therapy over 8 weeks with inhalative Ciclesonide leads to an increased expression of the proinflammatory IL-6 in CD3⁺ T-cells. The reasons for these findings remain speculative. A possible explanation is the susceptibility of the bronchial mucosa to viral infections due to reduced local immune defense. Furthermore, a decrease in T_H2 cells could allow previously suppressed IL-6 producing cells to express the cytokine to a higher degree. Further studies are necessary to evaluate this finding.

Verwendete Abkürzungen

AQLQ	Asthma Quality of Life Questionnaire
ACQ-5	Asthma Control Questionnaire
AR	Allergische Rhinitiker
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BHR	Bronchiale Hyperreagibilität
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CBA	Cytometric Bead Array
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
DNA	deoxyribonucleic acid
EA	Eosinophile Asthmatiker
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting
FEV ₁	Forciertes Expirationsvolumen in einer Sekunde
GCs	Glukokortikoide
GINA	Global Initiative for Asthma
GR	Glukokortikoidrezeptor
HDAC	Histondeacetylase
HKG	housekeeping gene
HSA	Humanes Serum Albumin
ICS	Inhalative Kortikosteroide
IFN γ	Interferon γ

IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
kPa	Kilopascal
mRNA	messenger ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid
NEA	Nicht-eosinophile Asthmatiker
NKT	Natural killer T-cells
OD	optische Dichte
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate-buffered saline
PE	Phycoerythin
p.i.	per inhalationem
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
SD	standard deviation
sRtot	totaler spezifischer Widerstand
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF- β	transforming growth factor β
T _H -Zellen	T-Helfer-Zellen
T _{Reg} -Zellen	Regulatorische T-Helfer-Zellen
TI	Tiffeneau-Index
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
V	Visite
VC	Vitalkapazität
WHO	World Health Organization

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
2	Stand der Forschung.....	12
2.1	Definition, Epidemiologie, Klinik und Therapie des Asthma bronchiale 12	
2.2	Ätiologie und Pathophysiologie	14
2.2.1	Klassisches pathophysiologisches Modell	14
2.2.2	Differenziertere Betrachtungsweisen – von Phänotypen zu Endotypen	15
2.2.3	Clusteranalysen	17
2.2.4	Mikroskopische Beurteilung des induzierten Sputums – eosinophiles und nicht- eosinophiles Asthma	20
2.3	Immunologische Grundlagen	22
2.3.1	Überblick – Wechselwirkungen zwischen Mediatoren des Krankheitsgeschehens 22	
2.3.2	T-Zellen und ihre Botenstoffe bei Asthma bronchiale	24
2.3.3	Effekt von Glukokortikoiden auf die Immunantwort und Resistenz gegen Glukokortikoide	27
2.4	Zielsetzung der Arbeit	31
3	Patienten, Material und Methoden	34
3.1	Arbeitsprogramm	34
3.2	Patienten	35
3.2.1	Ein- und Ausschlußkriterien für die Aufnahme in die Kohorten	35
3.2.2	Patientenrekrutierung.....	36
3.3	Material	37
3.3.1	Reagenzien und Medikamente	37
3.3.2	Verbrauchsmaterial und Geräte.....	37
3.3.3	Fertigsysteme („Kits“).	38
3.3.4	Primer	39
3.3.5	Software	39
3.3.6	Elektronische Datenbanken	40
3.4	Methoden	41

3.4.1	Pricktest.....	41
3.4.2	Lungenfunktionsprüfung.....	41
3.4.3	Bronchiale Provokation	42
3.4.4	Bronchospasmolyse	43
3.4.5	Induziertes Sputum	43
3.4.6	Isolierung CD3 ⁺ Zellen aus peripherem Blut.....	44
3.4.7	Aktivierung der CD3 ⁺ Lymphozyten	46
3.4.8	Molekularbiologische Methoden	47
3.4.8.1	Vorbemerkungen zum Arbeiten mit RNA und DNA.....	47
3.4.8.2	RNA-Isolation aus CD3 ⁺ Lymphozyten	48
3.4.8.3	Quantifizierung der Gesamt-RNA	48
3.4.8.4	DNase I Verdau	49
3.4.8.5	cDNA-Synthese.....	49
3.4.8.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
3.4.8.7	Primerdesign	51
3.4.8.8	Qualitative PCR	51
3.4.8.9	Gelelektrophorese	52
3.4.8.10	Quantitative PCR.....	53
3.4.8.11	Proteinquantifizierung: Cytometric Bead Array (CBA).....	54
3.4.9	Statistische Methoden	55
4	Ergebnisse	56
4.1	Charakterisierung der Kohorten	56
4.2	Ergebnisse bei Visite -1 und Visite 0 – Darstellung und Vergleich der Asthmatiker- und Nichtasthmatikergruppen	57
4.2.1	Induziertes Sputum und Pricktest	57
4.2.2	Lungenfunktion	57
4.2.3	Molekularbiologische Messungen	58
4.2.3.1	Messung der Zytokinexpression von nicht-aktivierten CD3 ⁺ Zellen	59
4.2.3.2	Messung der Zytokinexpression von aktivierten CD3 ⁺ Zellen.....	59
4.2.3.3	Zusammenfassung	65
4.3	Ergebnisse vor und nach 8-wöchiger Applikation von inhalativem Ciclesonid	66
4.3.1	Lungenfunktion bei Visite 0 und Visite 1.....	66
4.3.2	Molekularbiologische Messungen	67

4.3.2.1	Prä-Postvergleich der Zytokinexpression aktivierter CD3 ⁺ Zellen	67
4.3.2.2	Zusammenfassung	71
5	Diskussion	72
6	Literaturverzeichnis.....	91
7	Danksagung.....	98
8	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	99

1 Einleitung

Asthma bronchiale ist eine der häufigsten chronischen Krankheiten weltweit. Für die Betroffenen bedeutet sie eine Einschränkung der Lebensqualität, sozioökonomisch bringt sie beträchtliche direkte und indirekte Kosten mit sich. Dass sich trotz der hohen Prävalenz und Belastung seit den späten 60er-Jahren keine nennenswerten Fortschritte in der Behandlung von Asthma bronchiale abzeichnen, liegt vor allem an der Heterogenität der Erkrankung. In vielen Studien konnten die verschiedenen Ausprägungen der Erkrankung dargestellt werden, unter anderem konnte zuletzt aufgrund der an der bronchialen Inflammation beteiligten Effektorzellen zwischen eosinophilem und nicht-eosinophilem Asthma differenziert werden.^{7, 123}

Trotz zahlreicher bereits erfolgter Forschungsarbeiten ist es noch nicht gelungen, die komplexe Steuerung des Immunsystems und die zugrunde liegenden Pathomechanismen bei unterschiedlichen Asthmaphänotypen vollständig aufzuklären, insbesondere beim nicht-eosinophilen Phänotyp bleiben zahlreiche offene Fragen.³⁸ Eine wichtige Rolle in der Lenkung der Immunantwort wird T-Zellen zugeschrieben und es wird angenommen, dass sie für die Ausprägung der verschiedenen Phänotypen verantwortlich sind.¹²¹

Bisherige Studien haben ihren Fokus zumeist auf die Untersuchung von Material gelegt, das direkt bronchoskopisch aus den Luftwegen gewonnen wurde. So war es möglich, histopathologisch und direkt am Ort der Entzündung Informationen zu gewinnen. Es konnte so nachgewiesen werden, dass bei Allergikern T-Zellen in der Lunge ein anderes Zytokinprofil aufweisen als gesunde Probanden.¹⁹ Aber auch nach Isolation aus peripherem Blut konnte gezeigt werden, dass T-Zellen von atopisch veranlagten Patienten eine pathologisch alterierte Immunreaktion aufweisen.⁵² Dieses Ergebnis stützt die bereits häufig geäußerte Vermutung, dass die bestehende Deviation des gesamten Immunsystems für die verschiedenen Ausprägungen von Asthma bronchiale ursächlich ist. Da die Expression bestimmter Zytokine mit der Steuerung der Immunantwort in Zusammenhang gebracht wird, ist der Ansatz dieser Studie, die Zytokinexpression von T-Zellen auf systemischer Ebene zu untersuchen, um Zusammenhänge mit eosinophilen und nicht-eosinophilen Phänotypen aufzuzeigen.¹²³

Im folgenden Kapitel werden die Erscheinungsformen von Asthma bronchiale und der Stand der Forschung bezüglich bisheriger Versuche der Klassifizierung von Phänotypen, sowie bewährte und neue Therapieoptionen diskutiert. Die sich daraus ergebende Fragestellung dieser Arbeit wird in Abschnitt 2.4 dargelegt.

2 Stand der Forschung

2.1 Definition, Epidemiologie, Klinik und Therapie des Asthma bronchiale

Allein in Deutschland leiden laut WHO etwa 4 Millionen Menschen an Asthma bronchiale. Weltweit gehen konservative Schätzungen von etwa 300 Millionen Betroffenen aus, andere Erhebungen von mehr als 600 Millionen.^{1, 86, 117} Zwar ist die Mortalität mit global 250.000 Toten/Jahr angesichts der hohen Prävalenz vergleichsweise gering, bei Betroffenen führt die Krankheit jedoch zu einer deutlichen Abnahme der Lebensqualität – mit 15 Millionen verlorenen „disability adjusted life years“ (DALYs) ist Asthma bronchiale für 1% der weltweiten Krankheitslast verantwortlich und steht damit an 25. Stelle der Ursachen für verlorene Lebensjahre.^{1, 86}

Auch aus sozioökonomischer Sicht verursacht Asthma bronchiale direkt – durch Krankenhausaufenthalte, Medikation etc. – und indirekt – unter anderem durch Arbeitsausfälle und Frühberentung – beträchtliche Kosten; in Deutschland etwa 2 Mrd. Euro/Jahr, in den USA 12,7 Mrd. Dollar/Jahr.²¹ Ein überdurchschnittlich hoher Anteil der Kosten entsteht durch unzureichend behandelte Patienten sowie Non-Responder (etwa 10% der Asthmatiker), also Patienten, die nicht oder schlecht auf die Behandlung mit Glukokortikoiden ansprechen.^{20, 122} Die zum Teil zwischen den Studien stark variierenden Zahlen bezüglich der Prävalenz sind unter anderem Ausdruck des Problems, Asthma bronchiale exakt zu definieren und zu diagnostizieren. Asthma wird mittlerweile einheitlich eher als Syndrom unterschiedlicher Pathomechanismen gesehen denn als uniforme Erkrankung.⁷

Die internationale Konsensusdefinition ist daher deskriptiver Natur und beschreibt Asthma als chronisch entzündliche Funktionsstörung der Atemwege, die mit bronchialer Hyperreagibilität (BHR) vergesellschaftet ist und zu wiederkehrenden Episoden mit pfeifender Atmung, Atemnot, Thoraxenge und Husten, besonders nachts und am frühen Morgen, führt. Diese sind mit einer Verengung der Atemwege assoziiert, die spontan oder unter Therapie reversibel ist.¹ Manche Autoren fügen dieser Definition das Vorhandensein einer atopischen Veranlagung als stärkstem prädisponierenden Faktor hinzu.⁷⁴ Bei einem Teil der Patienten treten strukturelle Veränderungen von Lungengewebe in Form von Verdickungen der alveolären Basalmembranen auf.¹

Seit der Einführung von inhalativen Kortikosteroiden (ICS, synonym wird exakter der Begriff „inhalative Glukokortikoide“ verwendet) 1974 und β_2 -Adrenorezeptoragonisten 1969 sind keine wesentlichen Veränderungen in der Therapie von Asthma zu verzeichnen.⁷ Die beiden Therapeutika sind seither Grundlage der Controller-Therapie, welche eine Reduktion der Symptome und Anzahl von Exazerbationen auf ein Minimum zum Ziel hat. Mit leitlinienorientiertem Vorgehen kann häufig eine gute Kontrolle bei wenig eingeschränkter Lebensqualität erreicht werden.¹⁵ Auch wenn ICS als wirksamste Controller-Medikamente in der Asthmatherapie unverzichtbar sind, stehen sie im Verdacht, den Entzündungsprozess langfristig gesehen aufrecht zu erhalten und die zugrundeliegende Aberration des Immunsystems mittels Verstärkung der T_H2 -Immunantwort zu konsolidieren.^{6, 7} Bei schwerem, therapierefraktärem Asthma kommen auch systemische Glukokortikoide und IgE-Antikörper zum Einsatz, allerdings kann insbesondere die Anwendung systemischer Glukokortikoide (GCs) zu schweren Nebenwirkungen führen. Antikörper gegen Interleukin 5 (IL-5) konnten bei einer Subpopulation von Asthmatikern mit persistierender Sputumeosinophilie vielversprechende Ansätze zeigen.¹¹ Die Erkenntnis, dass Asthma bronchiale beim einzelnen Patienten durch jeweils unterschiedliche, komplexe („individuelle“) Pathomechanismen bedingt ist, legt die Anwendung von personalisierten Therapieregimen nahe.⁸⁹

In einer Vielzahl von Studien konnten in den letzten Jahren Erkenntnisse über zugrundeliegende Pathomechanismen der Erkrankung gewonnen werden. Aus diesen Erkenntnissen wurden Klassifikationen abgeleitet, deren Entwicklung im Folgenden dargestellt wird.

2.2 Ätiologie und Pathophysiologie

2.2.1 Klassisches pathophysiologisches Modell

Bereits früh wurden Versuche unternommen, Asthma zu klassifizieren und Ursachen zu benennen. 1947 führte Rackemann die Unterscheidung zwischen extrinsischem, im Wesentlichen allergisch bedingtem Asthma, und intrinsischem Asthma ein.¹⁰⁴ Noch in den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts war diese Unterscheidung gebräuchlich. Als einheitlicher, beiden Subtypen zugrunde liegender Pathomechanismus wurde die „Verletzung“ der Atemwegsschleimhaut durch eingewanderte eosinophile Granulozyten vermutet. Die eosinophile Entzündung erklärte auch die bronchiale Hyperreagibilität, die Steuerung erfolgte nach vorherrschender Meinung durch T-Zellen.³⁵

In der gleichen Zeit entstand auch die Hypothese, dass ein Überwiegen von T-Helferzellen vom Typ 2 (T_H2-Zellen) über T-Helferzellen vom Typ 1 (T_H1-Zellen) ursächlich sei für die Entstehung verschiedener entzündlicher (allergischer) Erkrankungen. Nach der Hygienehypothese seien die verminderte Exposition von Kindern aus Industrienationen gegenüber verschiedenen Krankheitserregern und die fehlende Auseinandersetzung des Immunsystems mit selbigen bei genetischer Prädisposition für die Verschiebung dieses Gleichgewichts verantwortlich. Ende der neunziger Jahre konnte außerdem von einigen Autoren gezeigt werden, dass Signalkaskaden der T_H2-Immunantwort eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Asthma im Mausmodell einnehmen.^{124, 131} In der Zusammenschau sah man Asthma bronchiale als im Wesentlichen allergische Krankheit mit fehlgeleiteter T_H2-Immunantwort, bei der neben Mast- und B-Zellen – unabhängig von der Ätiologie – hauptsächlich eosinophile Granulozyten als Effektorzellen bei der Schleimhautschädigung eine Rolle spielen.¹²⁰ Mit der Entwicklung von Therapien, die spezifisch die T_H2-Immunreaktion angreifen und blockieren, schien die Heilung von Asthma bronchiale zunächst nur eine Frage der Zeit zu sein.⁹

2.2.2 Differenziertere Betrachtungsweisen – von Phänotypen zu Endotypen

Enttäuschenderweise zeigte die zunächst im Mausmodell noch vielversprechende Inhibierung der T_H2 -Signalkaskaden von IL-4, IL-5 und IL-13 bei klinischen Studien kaum Wirkung.^{42, 72} Nur bei einer Subpopulation von Patienten mit schwerem, eosinophilem Asthma konnte der monoklonale IL-5-Antikörper Mepolizumab die Anzahl der Exazerbationen senken, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Symptomatik im Intervall und die Hyperreagibilität der Atemwege.¹¹ Auch der IgE-Antikörper Omalizumab konnte lediglich bei einer Subpopulation von „allergischen“ Asthmatikern die Anzahl der Exazerbationen und die therapeutisch erforderliche Glukokortikoiddosis senken.¹²³ T-Zell-Immunsuppressiva, die durch Inhibierung der T_H2 -Zellen einen starken Effekt haben sollten und bei anderen T_H2 -induzierten Krankheiten gute Erfolge erzielten, konnten die Symptomatik kaum beeinflussen.²⁶ Des Weiteren wurde etwa zeitgleich eine Gruppe von schweren Asthmatikern entdeckt, die histopathologisch keine Zeichen einer eosinophilen Entzündung zeigten und deren Symptomatik nur sehr unzureichend mit ICS kontrolliert werden konnte.¹²³

Die zentrale Rolle der T_H2 -Zellen blieb insbesondere bei allergischem Asthma unbestritten, die Realität schien jedoch komplexer zu sein als es das bisherige Modell erklären konnte. Es wurde deshalb eine pathophysiologische Klassifizierung von Asthma bronchiale gefordert, die zum einen diese Phänomene erklärt und darüber hinaus im Hinblick auf die Therapie Entscheidungen ermöglicht.²

A) Klassifizierung nach beobachtbaren Variablen: klassische Phänotypisierung

Die ersten Einteilungen von Asthma bronchiale beruhten auf klinischen oder histopathologischen Variablen. Klinische Variablen sind beispielsweise Adipositas, Vorhandensein von Allergien oder auch die Schwere des Asthmas. Als histopathologische Variablen können die Infiltration der Atemwege mit den unterschiedlichen Entzündungszellen oder die Dicke der Basalmembran als Unterscheidungskriterien herangezogen werden. Eine Einteilung anhand solcher Variablen nennt man Phänotypisierung, also die Einteilung nach beobachtbaren Gesichtspunkten.

Bei einem solchen Vorgehen sind bei Asthma bronchiale bislang nur mehr oder minder grobe, unspezifische Phänotypen entstanden, die zum Teil mehrere Krankheitsbilder und -verläufe zusammenfassen.

Beispiele für solche Phänotypisierungsversuche sind die bereits erwähnte Einteilung von Rackemann, der zusammenfasste, dass intrinsisches Asthma ohne klaren Auslöser hauptsächlich bei älteren, adipösen Frauen auftritt, während das extrinsische Asthma vor allem bei Kindern vorkommt und durch extrinsische Faktoren aus der Umwelt evokiert wird.¹⁰⁴ Auch das Vorhandensein einer atopischen Veranlagung und deren Manifestation wurden als Klassifikationskriterium genannt.

Eine weitere Einteilung erfolgte nach dem Schweregrad des Asthmas gemäß den GINA-Guidelines¹, schwere Asthmatiker stellen häufig eine große therapeutische Herausforderung dar.

Des Weiteren kann histopathologisch eine Einteilung nach den an der Inflammation beteiligten Effektorzellen erfolgen. Wie oben erwähnt konnte Ende der 90er Jahre erstmals das Vorhandensein nicht-eosinophiler Asthmasubtypen nachgewiesen werden. Jatakanon et al. und Wenzel et al. beschrieben 1999, dass die Atemwege einiger schwerer Asthmatiker weniger Eosinophile aufwiesen und dafür vermehrt mit neutrophilen Granulozyten infiltriert waren.^{64, 123} 2002 untersuchten Green et al. das induzierte Sputum von erwachsenen Asthmatikern und konnten zeigen, dass auch milderes Asthma in Subtypen mit divergenten inflammatorischen Zellfraktionen eingeteilt werden kann.⁴⁸

An der Vielzahl der Klassifikationen zeigt sich die Schwierigkeit, einheitliche, stringente Einteilungen zu finden. Als „wahren Phänotyp“, der diesen Einteilungsproblemen begegnen soll, bezeichnet Wenzel eine Klassifikation, in der konsistente klinische Charakteristika, Pathophysiologie und molekulare Signalkaskaden einer generell wirksamen Therapie zugeordnet werden können.¹²¹

B) Klassifizierung nach molekularen Signalwegen: Endotypisierung

Mit dem Fortschritt von molekularbiologischen Methoden und insbesondere der Microarrayanalyse konnten eine Vielzahl von Genen auf Expression untersucht werden und so auf molekularer Ebene Pathomechanismen aufgedeckt werden. Subpopulationen mit dem gleichen molekularen Signalweg nennt man auch Endotypen.

Woodruff et al.¹²⁶ konnten mittels Endotypisierung in Bürstenzytologien der Atemwege von Patienten mit Asthma einen T_H2-high-Typ und einen T_H2-low-Typ identifizieren, wobei sich der T_H2-low-Typ durch ein signifikant schlechteres Ansprechen auf ICS auszeichnet. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass nach einer Vorselektion Patienten mit T_H2-high-Asthma von einer gegen T_H2-Zytokine gerichteten Therapie profitieren.³⁴ Somit könnte diese Klassifikation in Zukunft einen wichtigen Beitrag zur Wahl der adäquaten Therapie leisten.

Von der Beschreibung „wahrer“ Phänotypen ist man aber noch ein gutes Stück entfernt. Die endotypische Einteilung ist bislang noch von dem Vorhandensein bzw. der Gewinnung bronchialer Gewebeproben abhängig und in der Praxis ist diese Einteilung daher nur für ein ausgewähltes Patientenkollektiv umsetzbar. Trotz der gemachten Fortschritte steht die vollständige wissenschaftliche Aufklärung der molekularen Signalwege und der Entstehung der Phänotypen noch aus. Die Phänotypisierung aufgrund einfach zu erhebender Variablen wird daher auch in Zukunft eine wichtige Rolle einnehmen. Da ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit die Charakterisierung von Phänotypen und die molekularbiologische Beschreibung der zugrundeliegenden Pathomechanismen ist, soll im Folgenden der aktuelle Stand der Forschung in Bezug auf die Phänotypisierung des Asthma bronchiale ausführlicher dargelegt werden.

2.2.3 Clusteranalysen

Die klassischen Phänotypisierungen beruhten zum großen Teil auf der klinischen Bewertung beobachtbarer Variablen, wie beispielsweise die Unterscheidung zwischen extrinsischen und intrinsischen Asthmatikern. Diese unspezifische Phänotypisierung anhand weniger Merkmale bedingte in klinischen Studien eine schlechte Vergleichbarkeit.

In der Severe Asthma Research Program (SARP)-Studie wurde deshalb 2010 der Ansatz gewählt, Asthmatiker nach statistischen Gesichtspunkten zu phänotypisieren.⁹⁰ 32 Kernvariablen von 726 Patienten mit schwerem Asthma wurden erfasst und gemäß der Ausprägung nach statistischer Analyse gleichartige Cluster gebildet.

Den gleichen Ansatz verfolgten Haldar et al.⁵¹ bereits 2008 in einer kleineren Studie. Es konnten so fünf Cluster identifiziert werden (Siehe Abbildung 1). Zwei der Cluster zeigten eine konkor-dante Beziehung zwischen der Entzündungsaktivität – gemessen an der Proportion von inflammatorischen Zellen im Sputum – und Symptomen.

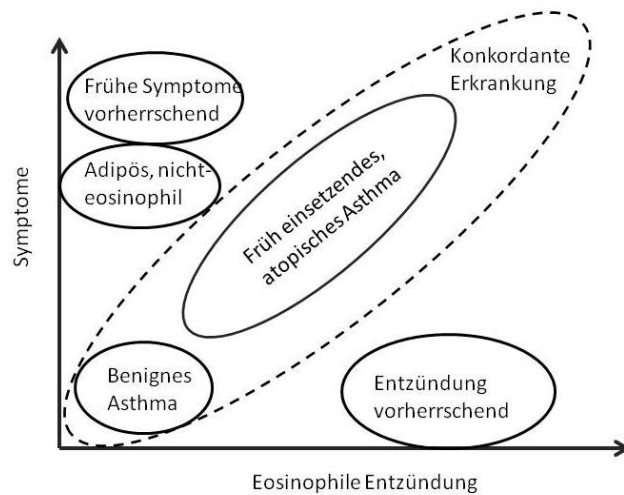


Abbildung 1: Clusteranalyse der Phänotypen nach Haldar et al.⁵¹

Zwei weitere Cluster zeigten starke Symptome aber geringe Zeichen einer bronchialen Inflammation, ein Cluster hohe Granulozytenzahlen im Sputum bei nur geringer Symptomatik, dafür im Verlauf mit erhöhter Anzahl an Exazerbationen. Die diskordanten Cluster zeigten eine Neigung zu therapierefraktären Symptomen. Green et al. konnten in diesem Zusammenhang in einer prospektiven, longitudinalen Studie zeigen, dass die Dosis des verabreichten ICS anhand der Zellcounts im Sputum titriert und dabei eine signifikante Besserung des Outcomes in Hinblick auf die Zahl von Exazerbationen und Hospitalisationen erreicht werden konnte.⁴⁷

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Endotypisierungsstudien konnten weitere Differenzierungen vorgenommen werden (siehe Abbildung 2).¹²¹ Eine wichtige Variable war der Zeitpunkt des Beginns der Beschwerden. Bei Kindern ist Asthma im Großteil der Fälle mit Allergien verknüpft und zumeist T_H2-assoziiert. Bei Erwachsenen spielen Adipositas, ASS-Intoleranz bei nasalen Polypen und eosinophiler Entzündung eine Rolle.

Clusteranalysen sind ein Werkzeug um histopathologische Befunde, klinische Beobachtungen und stabile Signalwege bei Subtypen einander zuzuordnen und so „wahre“ Phänotypen zu finden. Eine endgültige Klassifizierung ist aber nach wie vor noch nicht erreicht; bisherige Typisierungen sind in mancherlei Hinsicht, insbesondere im Hinblick auf die optimale Therapie, noch unbefriedigend.

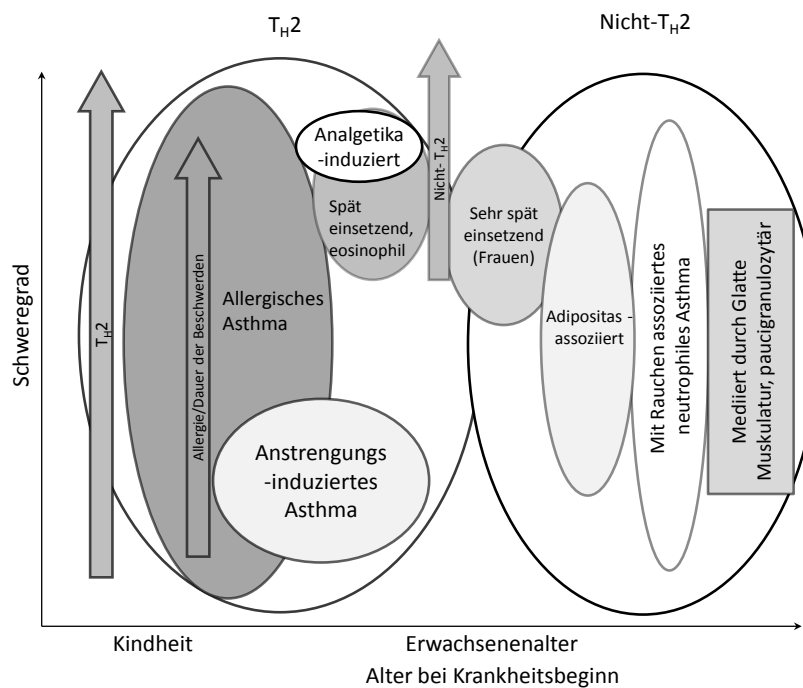


Abbildung 2: Phänotypisierung von Asthma bronchiale nach Wenzel et al.¹²¹

Wie oben beschrieben ist die Analyse der beteiligten Effektorzellen an der bronchialen Inflammation ein wichtiger Bestandteil von den meisten aktuell gängigen Phänotypisierungen. Die praktische Umsetzung der Phänotypisierung mittels Beurteilung des induzierten Sputums sowie die genauere Einteilung und Beschreibung der so diagnostizierten Phänotypen soll nun im Folgenden dargelegt werden.

2.2.4 Mikroskopische Beurteilung des induzierten Sputums – eosinophiles und nicht-eosinophiles Asthma

Um Informationen über die beteiligten Entzündungszellen bei unterschiedlichen Phänotypen zu sammeln, ist die histopathologische Beurteilung von Proben aus den Atemwegen unabdingbar. Die Induktion von Sputum mittels Inhalation hypertoner Kochsalzlösung ist eine nicht-invasive Methode, um Zellmaterial aus den unteren Atemwegen zu gewinnen.

Sie ist nicht regelhaft Teil der Diagnostik bei Asthma bronchiale, da die meisten praktizierenden Ärzte keinen einfachen Zugang zur entsprechenden Aufarbeitung und Analyse des Materials haben. Die Sputuminduktion erfordert zwar die Mitarbeit des Patienten, produziert aber bei guter Compliance und etwas Übung recht zuverlässige Daten mit ähnlichen Ergebnissen wie die bronchoalveoläre Lavage (BAL).⁵⁰

Granulozyten als Effektorzellen bei Asthma bronchiale sind keine ortsständigen Zellen. Deshalb ist die Zellzählung im bronchial-intraluminalen Material im Vergleich zu histologischen Untersuchungen von bronchialen Biopsien die geeignetere Methode, um eine Aussage über die Infiltration der Schleimhaut der unteren Atemwege bei Asthmatikern zu treffen.⁹⁸ Pin et al. zeigten 1992, dass die Zellzählung grundsätzlich reproduzierbar ist und nicht von der Hyperosmolarität des Inhalats beeinflusst wird.⁹⁹ Asthma ist jedoch ein variables Krankheitsbild und die Zusammensetzung der Zellinfiltration kann bei manchen Asthmatikern im Laufe der Zeit variieren und verändert sich durch die Therapie mit ICS.^{49, 99} Fleming et al. konnten zwar zeigen, dass die Anteile der Immunzellen im induzierten Sputum bei Kindern mit Asthma nur bei 37% der Probanden stabil sind, bei Erwachsenen scheinen die Zellfraktionen jedoch im zeitlichen Verlauf weitgehend konstant zu sein.^{41, 100} Erste Anzeichen für die Existenz unterschiedlicher Subtypen gab es bereits, als Fahy et al. bei Asthmatikern während einer Exazerbation einen neutrophilen Entzündungstyp nachweisen konnten.³⁹ Wenzel et al. unterschieden dann zwischen eosinophilen und weiteren nicht-eosinophilen Subtyp. Beim nicht-eosinophilen Subtyp konnte neben dem Fehlen von eosinophilen Granulozyten auch eine normale Basalmembrandicke im bronchialen Biopsat festgestellt werden.¹²³

In der Folge wurde von einigen Autoren nach unkontrollierten Studien ein Zusammenhang von Steroidresistenz und nicht-eosinophilem Asthma vermutet. Dieser Verdacht erhärtete sich in einer doppelblinden, placebokontrollierten Studie von Berry et al.¹⁶ In einer anderen Arbeit, die sich mit den längerfristigen Effekten von ICS beschäftigte, konnte die Steroiddosis bei nicht-eosinophilen Asthmatikern wesentlich gesenkt werden, ohne dass eine Verschlechterung der Symptomatik eintrat.⁴⁷

Nachdem in verschiedenen Studien im Sputum nicht-eosinophiler Asthmatiker Marker einer neutrophilen Entzündung gefunden werden konnten, wurden neue Hypothesen bezüglich Ätiologie und Pathogenese dieser Entzündungsart formuliert.⁴⁴ Als Auslöser wurden unter anderem Ozon, Zigarettenrauch, virale und bakterielle Infektionen, Umweltverschmutzung und berufsbezogene Irritantien diskutiert.⁹⁷ Man vermutete, dass diese eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems und eine Immunantwort durch T_H1-Zellen verursachen.¹¹⁰ In der Tat zeigte sich der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) Antagonist Etanercept wirksam, die Symptomatik bei therapierefraktären Asthmatikern zu verringern.¹⁷ In einer randomisierten, doppelblinden Studie verbesserte die Therapie mit dem Makrolidantibiotikum Clarithromycin die Symptomatik bei nicht-eosinophilen Asthmatikern (NEA) und verringerte die Marker einer neutrophilen Entzündungsreaktion, interessanterweise besonders bei Patienten mit steroidrefraktärem Asthma.¹¹¹ Warum Makrolide diesen Effekt haben, ist nach wie vor nicht bekannt. Möglicherweise spielt eine Inhibierung der Interleukin 8-Produktion in glatten Muskelzellen eine Rolle.¹¹⁸

Simpson et al. schlugen die Differenzierung der Phänotypen anhand der Zellfraktionen im induzierten Sputum in 4 Subtypen vor: einen eosinophilen (>3% eosinophile Granulozyten), einen neutrophilen (>61% neutrophile Granulozyten), einen gemischt-granulozytären mit erhöhten neutrophilen und eosinophilen Granulozytenanteilen, und einen sogenannten paucigranulozytären Subtyp, bei dem trotz asthmatypischer Klinik und Diagnostik keine erhöhten Granulozytenfraktionen im Sputum zu finden sind. Diese Phänotypen konnten im zeitlichen Verlauf konstant nachgewiesen werden.¹¹²

Darüber hinaus konnte in sich anschließenden Studien gezeigt werden, dass sich die vier Gruppen hinsichtlich der bronchialen Hyperreagibilität und der Konzentration von Stickstoffmonoxid (eNO, ein Marker für eosinophile Entzündungsaktivität) in der Ausatemluft unterscheiden.¹⁰¹ Patienten mit gemischt-granulozytärem Asthma wiesen in einer Studie von Hastie et al. die schlechteste Kontrolle und Lungenfunktion sowie die höchsten Gesundheitskosten aller Kohorten auf.⁵⁶

Zusammenfassend ist Asthma ein sehr heterogenes Krankheitsbild, für welches es noch keine optimale Klassifikation zur Phänotypisierung gibt. Zudem spielen bei manchen Patienten verschiedene pathogenetische Mechanismen gleichzeitig eine Rolle und machen zielgerichtete Therapien ineffektiv. Im Folgenden sollen nun zugrundeliegende immunologische Mechanismen, die für die Pathogenese der Erkrankung und für die phänotypischen Ausprägungen von Bedeutung sind, erläutert werden.

2.3 Immunologische Grundlagen

2.3.1 Überblick – Wechselwirkungen zwischen Mediatoren des Krankheitsgeschehens

Im Hinblick auf die molekularen Signalwege und Ansprechen auf ICS scheint die endotypische Unterscheidung zwischen T_H2 -assoziiertem Asthma und nicht- T_H2 -assoziiertem Asthma nach aktuellem Stand der Forschung das wichtigste Kriterium darzustellen. Eine Steuerungsfunktion bei T_H2 -assoziiertem Asthma übernehmen T_H2 -Lymphozyten und ihre Zytokine; zuvorderst sind hier IL-4, 5 und 13 zu nennen. Die hierdurch angestoßenen, immunologischen Prozesse werden im Folgenden als T_H2 -Immunität bezeichnet. Des Weiteren hat sich in neueren Studien gezeigt, dass bei bestimmten Asthmasubtypen auch andere T_H -Zellen eine zentrale Rolle spielen könnten, die wichtigsten Zusammenhänge und Erkenntnisse sollen im Folgenden beschrieben werden.

A) T_H2 -assoziiertes Asthma und die Interleukine 4, 5 und 13

Asthma wurde klassischerweise als T_H2 -assoziierte Krankheit angesehen und diese Sichtweise hat nach wie vor ihre Berechtigung. Ein Großteil der Asthmafälle – insbesondere Asthma, das im Kindesalter beginnt – ist auf T_H2 -Immunität zurückzuführen.

T_H2 -Immunität bedingt Atopie, Allergien und eosinophile Entzündung.⁹⁰ Weiterhin sind das schwere, therapierefraktäre, durch ASS-Intoleranz gekennzeichnete, eosinophile Asthma sowie das anstrengungsinduzierte Asthma der T_H2 -Immunität zuzurechnen (siehe Abbildung 2). Eine Sonderrolle spielt das anstrengungsinduzierte Asthma, es korreliert zwar nicht zwingend mit atopischer Veranlagung, molekulargenetisch konnte jedoch eine T_H2 -medierte Entzündung nachgewiesen werden.¹²¹

Auslöser von T_H2 -induzierten Entzündungen der Atemwege sind in den meisten Fällen Allergene. Nach allergeninduzierter Aktivierung von T_H2 -Zellen steuern diese mittels IL-4-Freisetzung die IgE-Produktion der B-Zellen und die Aktivierung von weiteren T-Lymphozyten. Zwei weitere T_H2 -spezifische Zytokine spielen eine wichtige Rolle: Mittels IL-5 werden eosinophile Granulozyten rekrutiert und durch IL-13 werden chronische Umbauprozesse im bronchialen Gewebe induziert, beispielsweise eine Hyperplasie der glatten Muskulatur und subepitheliale Fibrosierung.⁴⁰

Nach neueren Arbeiten ist daneben auch IL-6 wichtig für die Entwicklung von T_H2 -induzierten Entzündungen, da das Zytokin für die Differenzierung T_H2 -Zellen eine wichtige Rolle zu spielen scheint.¹⁰⁵

Nach der Arbeit von Choy et al. hat IL-4, im Gegensatz zu IL-5 und IL-13, vermutlich keine Verbindung zur chronischen, T_H2 -medierten Entzündung der Bronchien und spielt eher bei der Allergensensibilisierung eine Rolle; passend dazu konnte eine Reduktion der Symptomatik im Mausmodell nur erreicht werden, wenn eine ausschließlich gegen IL-4 gerichtete Therapie während der Sensibilisierungsphase begonnen wurde.^{30, 36} IgE-Antikörper, deren Produktion über IL-4 angeregt wird, können an Mastzellen binden, bei Aktivierung durch Allergene bewirken sie über die Ausschüttung von Histamin eine Bronchokonstriktion.

B) Nicht- T_H2 -assoziiertes Asthma

Bei etwa 50% der erwachsenen Asthmatiker dürfte nicht- T_H2 -bedingte Immunität für den Krankheitsprozess verantwortlich sein, es ist aber wenig über die zu Grunde liegenden Pathomechanismen bekannt.¹⁶

Häufig haben die Patienten trotz Beschwerden, die den diagnostischen Kriterien für Asthma entsprechen, eine weniger ausgeprägte bronchiale Hyperreagibilität. Des Weiteren wird oft eine nur gering ausgeprägte Bronchialobstruktion beobachtet. Aber auch sehr schweres Asthma, das kaum mit Glukokortikoiden zu kontrollieren ist, kommt vor. Patienten mit Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter und ohne Allergien sind am häufigsten dem nicht- T_H2 -assoziiertem Subtyp zuzuordnen.⁸⁵ Adipositas-assoziiertes Asthma, rauchinduziertes Asthma, sehr spät einsetzendes, neutrophiles Asthma und paucigranulozytäres, durch eine Erkrankung glatter Muskelzellen verursachtes Asthma gehören zu den bisher beschriebenen Subtypen (siehe Abbildung 2).

Bezüglich der Pathogenese nicht- T_H2 -assoziierten Asthmas besteht in vielerlei Hinsicht Unklarheit. Unter anderem könnten Irritantien wie Ozon oder Zigarettenrauch eine Rolle spielen. Sie verursachen die Entstehung von Epitheldefekten, IL-8-sezernierende Monozyten infiltrieren in der Folge das Epithel und könnten so die chronische, neutrophile Inflammation initiieren.¹²¹ Auch IL-17A-produzierende Zellen stehen im Verdacht in der Entstehung und Modulation der neutrophilen Entzündung eine Rolle zu spielen, dieser Pathomechanismus könnte eine Ursache für Steroidresistenz darstellen.^{78, 92} Des Weiteren könnten Prozesse der T_H1 -Immunität über Interferon γ Mastzelldegranulation verursachen und chemokinvermittelt zur Neutrophilenrekrutierung beitragen.¹²¹ Zahlreiche weitere Mechanismen werden diskutiert, eine Auswahl wird im Verlauf dieser Arbeit noch weiter ausgeführt.

2.3.2 T-Zellen und ihre Botenstoffe bei Asthma bronchiale

Allen T-Zellen gemein ist die Expression des „cluster of differentiation“ 3 (CD3), eines Co-Rezeptors des T-Zell-Rezeptors. T_H -Lymphozyten, die für die pathogenetischen Prozesse von Asthma bronchiale verantwortlich sind, üben ihre Funktion hauptsächlich vor Ort, also im pulmonalen Kompartiment aus. Dendritische Antigen-präsentierende Zellen unterhalb des bronchialen Epithels prozessieren Antigene und präsentieren diese in drainierenden Lymphknoten den T-Zellen. Bei entsprechender Aktivierung erfolgt das Chemokin-vermittelte Homing dieser Zellen in die Lunge und dort die Orchestrierung der Immunantwort.^{3, 61}

Als nicht-ortsständige Zellen sind sie aber auch in der Peripherie zu finden und während einer Exazerbation in erhöhter Anzahl in peripherem Blut nachweisbar.⁸¹ Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher periphere, CD3-positive (CD3⁺) T-Zellen untersucht.

Die Funktion von CD4⁺ T_H2-Lymphozyten wurde bereits oben beschrieben (Siehe 2.3.1), im Folgenden sollen weitere T_H-Zellen und assoziierte Zytokine vorgestellt werden, denen eine Rolle in der Pathogenese von Asthma bronchiale zugeschrieben wird.

A) T_H17-Zellen und IL-17A

Harrington et al. konnten 2005 im murinen Experiment eine bis dato unbekannte Art IL-17-produzierender T-Zellen nachweisen.⁵³ Diese sogenannten T_H17-Zellen sind in ihrer Differenzierung nach bisherigen Erkenntnissen hauptsächlich von transforming growth factor β (TGF- β) und IL-6 abhängig und scheinen bei chronischen Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle zu spielen.¹⁸ T_H17-Zellen konnten im Mausmodell nach Allergieinduktion vermehrt nachgewiesen werden. Dabei verursachten sie BHR und eine neutrophile Entzündung bei inhalativer Allergenexposition.^{57, 125} IL-17A-Depletion vor erneuter Allergenexposition führte jedoch zu einer Verschlechterung der Lungenfunktion, so dass auch von einer regulatorischen Funktion des Zytokins auszugehen ist.¹⁰⁹ Bei Studien mit humanen Sputumproben konnte eine positive Korrelation zwischen Infiltration der Atemwege mit Neutrophilen, IL-17A-Sekretion auf mRNA-Ebene und Expression der mRNA des chemotaktischen Zytokins der neutrophilen Granulozyten IL-8 gezeigt werden; es bestand außerdem eine positive Korrelation zwischen der Schwere der Symptomatik und der Menge der nachgewiesenen IL-17A-mRNA.²³

Auch V γ 4⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen produzieren IL-17A, in Mausmodellen waren sie gegenüber T_H17-Zellen im Lungenkompartiment sogar vorherrschend und könnten auch beim Menschen eine größere Bedeutung für Steuerung der Immunität haben als bislang bekannt.⁹²

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wird angenommen, dass T_H17 -Zellen und IL-17-Zytokinen bei der Ausprägung von nicht-eosinophilem und insbesondere bei schwerem, neutrophilem Asthma, zumindest bei einem Teil der Patienten, eine wichtige Rolle zukommt.

B) Regulatorische T-Zellen (T_{Reg} -Zellen) und IL-10

Die inhibitorischen T-Zellen bremsen durch verschiedene Mechanismen überschießen-
de Immunantworten. Regulatorische T-Zellen entfalten ihre Funktion über die Sekretion der Zytokine TGF- β und IL-10 sowie anderer inhibitorischer Moleküle wie CTLA4.⁶⁷ T_{Reg} -Zellen können auch in anderen $CD4^+$ Zellen IL-10-Sekretion induzieren.⁸¹ Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein Transfer von T_{Reg} -Zellen auf defiziente Mäuse die BHR und Entzündung der Atemwege reduziert; es wurde gefolgert, dass die Funktion der regulatorischen T-Zellen bedeutsamer für die Inhibition von Entzündungsreaktionen ist als die direkte Wirkung von IL-10.^{25, 96, 115} Eine verminderte oder defektive IL-10-Sekretion wurde bei schweren Asthmatikern auch als pathogenetischer Faktor und als Grund für Glukokortikoidresistenz diskutiert (siehe 2.3.3).^{76, 128} Es bleibt fraglich, ob ein IL-10-Mangel auch bei mildem Asthma eine Rolle spielt und ggf. einen Mechanismus bei nicht-eosinophilem Asthma darstellt.

Beachtenswert erscheint im Zusammenhang mit regulatorischen Mechanismen die Funktion von alternativ aktivierten Makrophagen in der Lunge. Sie besitzen ebenfalls regulatorische Funktionen, unter anderem über die Expression von IL-10, aber auch proinflammatorische Funktionen durch die Expression von IL-4, IL-13 und anderen Zytokinen. Welche Rolle alternativ aktivierte Makrophagen in unterschiedlichen Situationen übernehmen und inwiefern sie an der Pathogenese von Asthma bronchiale beteiligt sind bleibt aber noch zu klären.^{24, 46}

C) Sonstige T-Zellen

$CD4^+$ T_H1 -Zellen produzieren Interferon γ (IFN γ) und haben aufgrund ihrer inhibierenden Wirkung auf T_H2 -Zellen möglicherweise einen protektiven Effekt. Bei Exazerbationen sind sie jedoch im Blut und im Sputum in erhöhter Zahl zu finden und könnten hier eine pathogenetische Funktion haben.⁸³

IL-6 als klassisches proinflammatorisches Zytokin wird zwar hauptsächlich von Stromazellen und Epithelzellen, jedoch auch von $CD4^+$ Effektor-T-Zellen bei Stimulation durch verschiedene Reize (Viren, körperliche Anstrengung und Umwelttoxene) gebildet. In neueren Arbeiten wird auch seine Beteiligung an allergischen und autoimmunen Prozessen diskutiert und ist an der Differenzierung von T_H2 -Zellen und T_H17 -Zellen beteiligt.^{37, 105} Virchow et al. beschrieben eine erhöhte Konzentration von IL-6 in der BAL von Patienten mit „intrinsischem“ Asthma, die Bedeutung von IL-6 in der Pathogenese von nicht-allergischem Asthma wurde diskutiert.^{105, 119}

$CD8^+$ T-Zellen sind zytotoxische T-Zellen. Ihre Zahl in der BAL korreliert mit dem Schweregrad von Asthma und in der Gegenwart von $CD4^+$ T_H2 -Zellen tragen sie durch die Produktion der Interleukine 4, 5 und 13 zu eosinophiler Entzündung bei.²⁸

Auch Natural Killer T-Cells (NKT) verursachen BHR und produzieren IL-13.⁹⁴ Sie stehen ebenfalls im Verdacht neutrophile Entzündung als Reaktion auf verschmutzte Atemluft oder Zigarettenrauch zu verursachen.⁶⁹

Es stehen noch zahlreiche weitere Immunzellen im Verdacht an der Pathogenese von Asthma bronchiale beteiligt zu sein, im Rahmen dieser Arbeit wurden nur die wichtigsten angeführt.

2.3.3 Effekt von Glukokortikoiden auf die Immunantwort und Resistenz gegen Glukokortikoide

Abschließend soll auf Glukokortikoidresistenz bei Asthmatikern eingegangen werden. Bei schwerem, therapierefraktärem Asthma liegt in der unzureichenden Wirksamkeit von GCs ein wesentlicher Grund für die problematische Therapiesituation dieser Patienten. Bei leichtem, intermittierendem Asthma könnten bei bekannter Ineffektivität von ICS bei bestimmten Asthma-Subtypen unnötige Therapien vermieden werden.

A) Subsensitivität und Resistenz gegenüber Glukokortikoiden - Definitionen

Die klinische Wirksamkeit von Glukokortikoiden kann bei einzelnen Patienten graduell unterschiedlich sein, weshalb exakte Kriterien der Glukokortikoidresistenz schwierig zu bestimmen und von der Symptomatik des Patienten abhängig sind.⁶²

Klinisch wird Glukokortikoidresistenz in Studien unterschiedlich definiert, im Allgemeinen wird darunter eine mangelnde Besserung der Symptomatik unter systemischer und topischer Glukokortikoidtherapie verstanden. Eine absolute Glukokortikoidresistenz ist aber sehr selten und stellt ein Extrem auf dem Spektrum der Glukokortikoidsensitivität dar.¹² Barnes et al. haben beispielsweise in ihrer Studie von 1995 Glukokortikoidresistenz bei Asthmatikern diagnostiziert, wenn eine bronchiale Obstruktion durch β_2 -Sympathomimetika reversibel gewesen ist, aber trotz hochdosierter, systemischer Glukokortikoidtherapie über 14 Tage fortbestanden hat.¹⁴ Bei Patienten, die dauerhaft orale GCs als Controller-Therapie benötigen, spricht man auch von glukokortikoidabhängigem Asthma bronchiale.¹²

B) Wirkung von Glukokortikoiden

Glukokortikoide sind effektive Therapeutika bei verschiedenen chronischen Erkrankungen. Bei Asthma sind sie als Controller in inhalativer Form die Therapie der ersten Wahl. Sie entfalten ihre antiinflammatorische Wirkung durch eine Vielzahl an Mechanismen und sind wegen der Breite ihres Wirkspektrums so effektiv.¹²

GCs sind zum einen auf transkriptioneller Ebene wirksam. Sie aktivieren Gene, die Proteine mit antiinflammatorischer Wirkung kodieren; Beispiele sind Annexin-1 und Interleukin 10 oder auch den Inhibitor von NF- κ B (I κ B- α).¹⁰ Als bedeutsamer wird allerdings die suppressive Wirkung von GCs auf proinflammatorische Proteinbildung durch Bindung an Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, AP-1) und die Herunterregulierung der NF- κ B Bildung angesehen.^{13, 63} Die inhibitorische Wirkung von GCs wird unter anderem durch die Rekrutierung von Histondeacetylasen (HDACs) vermittelt. Eine Hypoacetylierung der DNA führt zu verringerter Transkription und damit Deaktivierung der entsprechenden DNA-Abschnitte.¹²

Glukokortikoide können aber auch die Stabilität der Boten-Ribonukleinsäuren (mRNA) einiger Proteine beeinflussen und so posttranskriptional antiinflammatorisch wirksam sein.⁸ Etwa 100 Gene werden von GCs in ihrer Expression verändert. Dazu gehören auch die Gene, die bei der T_H2-Immunität eine Rolle spielen und durch GCs herunterreguliert werden.

C) Ursachen von Glukokortikoidsensitivität und -resistenz

In der Literatur werden unterschiedliche Mechanismen der Glukokortikoidresistenz diskutiert. Die Inzidenz von Glukokortikoidresistenz ist in einigen Asthma-Subpopulationen (siehe Kapitel 2.2.4) höher als in anderen. Berry et al. und McGrath et al. konnten zeigen, dass ICS bei nicht-eosinophilen Asthmatikern einen schlechteren therapeutischen Effekt haben als bei eosinophilen Asthmatikern.^{16, 87} Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass GCs auf zellulärer Ebene in eosinophilen Granulozyten apoptosefördernd wirken und andererseits die Lebenszeit von Neutrophilen verlängern.⁶² In neutrophilen Granulozyten konnte darüber hinaus vermehrt der Subtyp GR- β des Glukokortikoidrezeptors nachgewiesen werden. Dieser weist eine deutlich schlechtere Bindung an GCs auf und wirkt als Glukokortikoidinhibitor.^{12, 62} Bei Persistenz der maßgeblichen Effektorzellen und bei auf molekularer Ebene geringerer Effektivität des ligierten Glukokortikoidrezeptors in neutrophilen Granulozyten sprechen neutrophile Entzündungen schlechter auf die Therapie mit GCs an. Auch das Zytokin IL-17A verursacht in erhöhten Konzentrationen in bronchialen Epithelzellen eine neutrophile Inflammation.¹³² Darüber hinaus vermittelt IL-17A vermutlich über die Reduktion der Histondeacetylaseaktivität Glukokortikoidresistenz.¹³²

Patienten mit schwerem Asthma bronchiale werden manchmal auch als eigene Krankheitsentität gesehen. Wie oben bereits erwähnt ist bei ihnen Glukokortikoidsensitivität besonders häufig. Zum einen sind bei einem großen Teil bereits pulmonal strukturelle Veränderungen – wie eine Verdickung der Basalmembran – eingetreten und die Obstruktion somit gewissermaßen „fixiert“.⁶² Zum anderen führen auf molekularer Ebene stark erhöhte Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere der Zytokine IL-2, IL-4 und IL-13, zu Modifikationen des Glukokortikoidrezeptors. Diese können seine Translokation aus dem Zytoplasma in den Nukleus behindern oder seine Bindungsaffinität beeinträchtigen.^{12, 62} Es wurde vermutet, dass diese Zytokine auch den oben erwähnten Glukokortikoidrezeptorsubtyp GR- β induzieren, der aufgrund seiner gegenüber GR- α verlängerten Halbwertszeit im Nukleus akkumuliert und zu Glukokortikoidsensitivität führt.

In mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) therapierefraktärer Asthmatiker wurde GR- β von Leung et al. in erhöhter Konzentration nachgewiesen, andere Arbeiten konnten dieses Ergebnis aber bislang nicht bestätigen.^{62, 75} Schweres Asthma mit verminderter Glukokortikoidsensitivität kann mitunter aus diesen Gründen auch bei Asthmatikern mit eosinophilem Phänotyp auftreten.

Xystrakis et al. konnten zeigen, dass periphere Immunzellen von glukokortikoidresistenten Asthmatikern gegenüber Immunzellen von glukokortikoidsensitiven Asthmatikern in vitro mit einer signifikant erniedrigten Sekretion von IL-10 auf die Stimulation mit Dexamethason reagieren.¹²⁸ Lim et al. zeigten, dass bei einigen schweren Asthmatikern ein Gen-Polymorphismus vorliegt, der mit einer verminderten IL-10-Synthese in PBMCs einhergeht.⁷⁶ Defektive IL-10-Sekretion könnte folglich einen weiteren Mechanismus der Glukokortikoidresistenz darstellen.¹²⁸

Ito et al. haben 2006 zuerst nachgewiesen, dass in Alveolarmakrophagen von COPDlern die Aktivität der HDAC 2 herabgesetzt ist.⁶³ Kurze Zeit später konnten Hew et al. entsprechende Veränderungen auch in PBMCs von Patienten mit therapierefraktärem Asthma nachweisen.⁵⁹ Es wurde gezeigt, dass oxidativer Stress unter anderem mittels Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase- δ zur Phosphorylierung und so zur Inaktivierung der HDAC 2 führt.¹²

Die verschiedenen Mechanismen treten möglicherweise auch in Kombination auf und können so zu einer Verstärkung der Glukokortikoidsensitivität bis hin zur Resistenz führen. Das Verständnis dieser Mechanismen ist essenziell um jedem Patienten eine adäquate, wirksame Therapie zukommen zu lassen. Im Rahmen dieser Arbeit ist der Bezug zum nicht-eosinophilen Phänotyp gegeben, bei dem eine Glukokortikoidsensitivität gezeigt wurde.¹⁶ Die Expression regulatorischer und proinflammatorischer Zytokine spielt bei der Vermittlung von Glukokortikoidsensitivität eine wichtige Rolle und soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch aus diesem Grund weiter erforscht werden.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der Komplexität und Heterogenität des Syndroms Asthma bronchiale sind hinsichtlich der pathogenetischen Hintergründe noch zahlreiche Fragen offen. Daraus resultierend sind Ansatzpunkte für effektive Therapien der Erkrankung begrenzt und nur unvollständig erforscht. Bisherige Erkenntnisse legen nahe, dass T-Zellen zumindest bei einem Großteil der Patienten eine zentrale Stellung in der Steuerung der Immunantwort bei atopisch-entzündlichen Prozessen, wie dem Asthma bronchiale, einnehmen. Ihr gemeinsames Kennzeichen ist die Expressierung des Oberflächenmoleküls CD3. Die Steuerung erfolgt über verschiedene Mechanismen, einer der wichtigsten ist die Sekretion von Zytokinen. Beim Asthma bronchiale unterscheidet eine plausible Klassifikation zwischen eosinophilem und nicht-eosinophilem Asthma. Diesen Asthma-typen liegen unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde. Bezüglich deren Grundlagen gibt es weiterhin viele zu klärende Fragen, insbesondere hinsichtlich der Rolle der CD3⁺ T-Zellen, die bisher nur selten oder gar nicht untersucht wurden, da bislang meist CD4⁺ T-Zellen im Mittelpunkt des Interesses standen. Hansel et al. konnten so beispielsweise zeigen, dass sich in peripher zirkulierenden, unstimulierten CD4⁺ T-Zellen von Atopikern und Nicht-Atopikern die Zytokinexpression in der Microarray-Untersuchung signifikant unterschied.⁵² Ob das Zytokinprofil CD3⁺ T-Zellen nun zwischen eosinophilem und nicht-eosinophilem Asthma differenzieren kann, bzw. hinsichtlich der phänotypischen und klinischen Charakteristika der Subtypen eine Rolle spielt, ist weitgehend offen und soll daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

In einem ersten, einleitenden Schritt soll als Weiterführung des Gedankenansatzes der oben genannten Arbeit von Hansel et al.⁵² die Zytokinexpression von CD3⁺ T-Zellen bei Patienten mit allergischer Rhinitis untersucht werden. Die allergische Rhinitis gilt als typische atopische Erkrankung mit einer Verschiebung der Immunantwort hin zu T_H2-Immunität und Eosinophilie. Auch bei allergischen Rhinitikern wurde während der Exposition gegenüber Allergenen BHR und bronchiale eosinophile Entzündung festgestellt, daher wurde von manchen Autoren eine Kontinuität zwischen Asthma bronchiale und allergischer Rhinitis angenommen.⁵

Das Phänomen, dass Kinder zunächst unter Heuschnupfen leiden und später Asthma bronchiale hinzutritt, wurde unter dem Begriff „atopischer Marsch“ bekannt. Braunstahl bezeichnete in seinem „United Airways Concept“ daher allergische Rhinitis und Asthma als Ausprägungen der gleichen Erkrankung.²² Zu beantworten wäre daher zunächst die Frage, ob die Zytokinexpression von peripheren T-Zellen bei Patienten mit allergischer Rhinitis im Vergleich zu Asthmatikern und/oder Gesunden verändert ist und sich daraus Hinweise für eine generelle „Lageverschiebung“ des Immunsystems bei Erkrankungen des atopischen Formenkreises ableiten lassen.

In einem zweiten Schritt sollen immunologische Unterschiede zwischen den beiden Asthma-Phänotypen, dem eosinophilen und nicht-eosinophilen Asthma, untersucht werden. Es wäre zu beantworten, ob nicht-eosinophiles Asthma mit verstärkter Expression von IL-17A einhergeht und analog eosinophiles Asthma als atopische Erkrankung mit der Expression von IL-4, 5 und 13. IL-6 ist für die Differenzierung von T_H2-Zellen und T_H17-Zellen wichtig und diese Zellen könnten für die Ausprägung von eosinophilen und nicht-eosinophilen Phänotypen entscheidend sein. Es ist zu klären, ob IL-6 bei einem der beiden Phänotypen verstärkt exprimiert wird. Des Weiteren soll erforscht werden, ob zwischen EA und NEA ein Unterschied in der Expression von IL-10 auszumachen ist. Hierbei geht es um die Frage, ob möglicherweise ein IL-10-Mangel in der Pathogenese eines Phänotyps eine Rolle spielt.

Drittens soll die Auswirkung einer antiinflammatorischen Therapie evaluiert werden. Die effektivste Controller-Therapie bei Asthma bronchiale sind inhalative Kortikosteroide. Sie verbessern die Symptomatik bei einem Teil der Patienten, wobei auch hier die Wirkmechanismen nur zum Teil bekannt sind und molekulare Mechanismen bis heute spekulativ geblieben sind. Es wurde vermutet, dass ICS hauptsächlich bei eosinophilem Asthma wirksam sind. Es sollte daher der Einfluss von inhalativem Ciclesonid auf die Zytokinexpression peripherer CD3⁺ T-Zellen bei eosinophilen und nicht-eosinophilen Asthmatikern vor und nach einer achtwöchigen Therapie untersucht werden.

Zusammenfassend ergeben sich daher die folgenden drei aufeinander aufbauenden Forschungsfragen:

1. Zeigen Patienten mit allergischer Rhinitis gegenüber Gesunden einen Unterschied in der Zytokinexpression?
2. Gibt es einen Unterschied in der Zytokinexpression peripherer CD3⁺ T-Zellen der oben genannten Zytokine bei eosinophilen und nicht-eosinophilen Asthmatikern? Gibt es einen Unterschied der Zytokinexpression zwischen Asthmatikern im Allgemeinen und Gesunden?
3. Verändert sich die Zytokinexpression der peripheren CD 3⁺ T-Zellen von eosinophilen und nicht-eosinophilen Asthmatikern nach einer achtwöchigen Therapie mit inhalativem Ciclesonid?

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Arbeitsprogramm

Die Probanden wurden nach Diagnose in drei Kohorten eingeteilt: Gesunde Personen, Patienten mit allergischer Rhinitis und Patienten mit Asthma bronchiale. Patienten mit der Diagnose Asthma kamen zu drei Terminen in die Klinik. Allergische Rhinitiker (AR) und gesunde Kontrollpersonen kamen nur zu einem ersten Termin. Bei Asthmatikern wurde beim zweiten Termin weitere spezifische Diagnostik und beim dritten Termin eine Verlaufskontrolle aller Parameter nach achtwöchiger inhalativer Therapie mit Ciclesonid durchgeführt. Eine Übersicht des zeitlichen Ablaufs der zentralen Untersuchungen ist in Abbildung 3 dargestellt.

Beim ersten Termin (Visite -1, Abk. V-1) wurde in erster Linie die entsprechende Diagnose bestätigt und Probanden der zutreffenden Kohorte zugewiesen. In diesem Rahmen wurde eine Anamnese erhoben, des Weiteren eine körperliche Untersuchung, eine Lungenfunktion mit bronchialer Methacholinprovokationstestung und ein Pricktest durchgeführt. Außerdem wurden das induzierte Sputum der Patienten untersucht, Blut für die Genexpressionsanalyse und ein Basislabor abgenommen sowie zwei Scores zur Evaluation von Lebensqualität und Symptomatik erfasst, der Asthma Quality of Life Questionnaire (AQLQ) und der Asthma Control Questionnaire (ACQ-5).

Der zweite Termin (Visite 0, Abk. V0) fand eine Woche nach dem ersten statt. Erneut wurde das induzierte Sputum untersucht und darüber hinaus eine Lungenfunktion vor und nach einmaliger Inhalation von 400 µg Salbutamol durchgeführt. Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt, die jedoch nicht unmittelbar im Zusammenhang mit dieser Arbeit stehen und darum nicht näher erläutert werden.

Im Anschluss erhielten die Patienten mit Asthma bronchiale einen Inhaler zur Applikation von 160 µg Ciclesonid per die bis zur nächsten Visite. Ciclesonid ist ein relativ neuartiges Prodrug eines Glukokortikoids, das ein etwas günstigeres Nebenwirkungsprofil gegenüber anderen ICS aufweisen soll; der endgültige Nachweis steht allerdings noch aus.⁷¹

Der dritte Termin (Visite 1, Abk. V1) erfolgte 8 Wochen nach Visite 0 und nach der inhalativen Therapie mit Ciclesonid, die Untersuchungen aus Visite -1 mit Ausnahme des Pricktests wurden erneut durchgeführt.

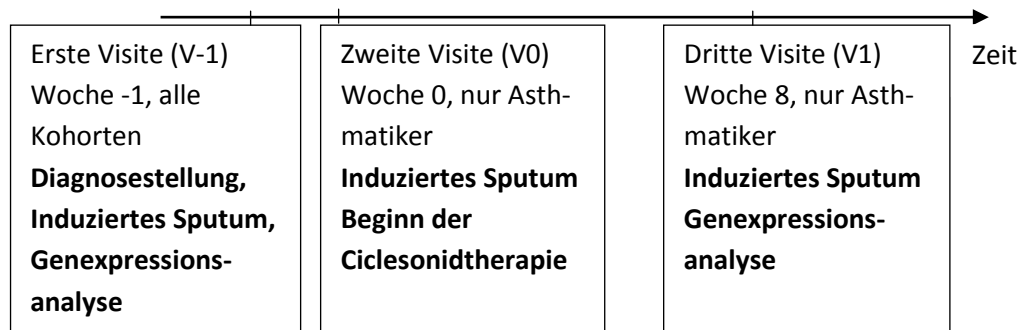


Abbildung 3: Zeitlicher Ablauf der wichtigsten Untersuchungen

3.2 Patienten

Die Studie wurde von der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Marburg genehmigt (AZ 83/10); eine schriftliche Einverständniserklärung aller Patienten lag vor.

3.2.1 Ein- und Ausschlußkriterien für die Aufnahme in die Kohorten

Patienten wurden nach folgenden Kriterien in eine der beiden Asthmakohorten aufgenommen:

Einschlusskriterien:

- Alter zwischen 18 und 65 Jahren
- FEV₁ von ≥ 60 % des Sollwertes
- Reversible Atemwegsobstruktion (Erhöhung der FEV₁ um 200 ml und um 12% des Ausgangswertes nach 400 µg Salbutamol) oder positiver Methacholintest
- Eine Asthma-typische Anamnese gemäß den GINA-Guidelines

Ausschlusskriterien:

- COPD oder andere relevante bronchopulmonale Erkrankung (außer Asthma)
- Infektionen des Respirationstraktes während der letzten 30 Tage vor Visite -1
- Einnahme von systemischen oder Anwendung von inhalativen Steroiden bis 3 Monate vor Einschluss

- Einnahme von Beta-Blockern
- Nicht-stabiler Phänotyp bezüglich Sputum-Eosinophilie zum Zeitpunkt V0
- Aktive Raucher sowie Ex-Raucher seit weniger als 1 Jahr, anamnestisch erhebbarer Nikotinabusus ≥ 1 Packungsjahr
- Jede signifikante Erkrankung oder Störung, welche nach Meinung des Untersuchers den Patienten im Laufe der Studie einem Risiko aussetzt oder die Ergebnisse der Studie beeinflusst
- Geplante Hospitalisierung im Laufe der Studie
- Jedes klinisch relevante abnorme Untersuchungsergebnis in der klinischen Untersuchung bei Visite 1
- Teilnahme an einer anderen klinischen Studie in den letzten 30 Tagen vor Beginn dieser Studie

Die Patienten wurden als eosinophile Asthmatiker (EA) bei einem Eosinophilenanteil $\geq 3\%$ der Zellen im induzierten Sputum klassifiziert und als nicht-eosinophile Asthmatiker (NEA) bei einem Anteil von $< 3\%$. Aufnahme in die Kohorte der Rhinitiker erfolgte bei anamnestisch vorhandener allergischer Rhinitis sowie bei Erfüllung der oben genannten, anwendbaren Ein- und Ausschlusskriterien.

3.2.2 Patientenrekrutierung

Patienten wurden durch Werbung in regionalen Zeitungen und durch die allergologische Sprechstunde der Hochschulambulanz der Universitätsklinik Marburg, sonstige Probanden aus dem privaten Umfeld der Arbeitsgruppenmitglieder rekrutiert.

3.3 Material

(soweit nicht im Text angegeben)

3.3.1 Reagenzien und Medikamente

Hersteller	Reagenz
Altana AG, Wesel, Deutschland	Ciclesonid Dosieraerosol, 160 µg
Alk-Abelló, Hamburg, Deutschland	Pangramin® Prick, verschiedene Allergenlösungen (i.E. siehe 3.4.1), Histamindihydrochloridlösung 1%, NaCl 0,9%
Biochrom AG, Berlin, Deutschland	Ficoll-Paque™ Separating Solution
B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	Aqua dest. NaCl 0,9% NaCl 10%
GlaxoSmithKline, London, UK	Sultanol
Merck, Darmstadt, Deutschland	May-Grünwald Eosin-Methylenblaulösung Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung
Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	Rinsing Solution (PBS + 2 mM EDTA) MACS® BSA Stock Solution (PBS + 10% BSA)
PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	Dulbecco's PBS RPMI 1640 Nährmedium
Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland	Dithiothreitol DL Trypanblau; REDTaq® DNA Polymerase

3.3.2 Verbrauchsmaterial und Geräte

Hersteller	Material/Gerät
Alk-Abelló, Hamburg, Deutschland	ALK Lancet für Pricktest
Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland	PCR Tubes 0,5 ml, RNase und DNase frei
Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland	Zentrifuge Rotina 380 R

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland	Pipettierhilfe pipetus®
Karl Hecht GmbH & co. KG – „Assistent“, Sondheim, Deutschland	Rollenmischer RM 5 Neubauer Zählkammer
Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland	Mikroskop Laborlux 12
Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland	Zellseparator autoMACS® Pro Separator
Roche Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland	Zellzähler Casy® Model TT
Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland	Falcon™ Tubes 15 ml, 50 ml Petrischalen Silane beschichtete Objektträger Deckgläser Einmalpasteurpipetten Cytospin 2
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Tischzentrifuge Heraeus Fresco 21

3.3.3 Fertigsysteme („Kits“)

Hersteller	Kit
BD Biosciences, Franklin, NJ, USA	Interleukin 1β, 4, 5, 6, 10, 13, 17A Flex Set Human Soluble Protein Master Buffer Kit
Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	DNase I, Amplification Grade
Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland	Pan T Cell Isolation Kit II human
Qiagen, Hilden, Deutschland	RNeasy Mini Kit Omniscript RT Kit Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit

3.3.4 Primer

Die Primersynthese erfolgte bei der Firma TIB MOLBIOL GmbH (Berlin, Deutschland). Wurde die Sequenz aus einer Publikation entnommen, ist die Quelle angegeben.

Amplikon	Primersequenz	Produktlänge (bp)	Quelle
IL-5	5'-AGCCAATGAGACTCTGAGGA-3' (forward) 5'-CAGTACCCCCTTGACAGTT-3' (reverse)	116 bp	
IL-6	5'-GGTACATCCTCGACGGCATCT-3' (forward) 5'-GTGCCTCTTGCTGCTTTCAC-3' (reverse)	81 bp	Steensberg et al. 2002 ¹¹³
IL-10	5'-ATCAAGGCGCATGTGAACTC-3' (forward) 5'-GCATTCTTCACCTGCTCCAC-3' (reverse)	122 bp	
IL-13	5'-ATTGCTCTCACTTGCCTTGG-3' (forward) 5'-CTGGTTCTGGGTGATGTTG-3' (reverse)	105 bp	Gonzalez et al., 2012 ⁴⁵
IL-17A	5'-CAATCCCACGAAATCCAGGATG-3' (forward) 5'-GGTGGAGATTCCAAGGTGAGG-3' (reverse)	156 bp	Qin et al., 2012 ¹⁰²
RPL32	5'-GCTGCTGATGTGCAACAAAT-3' (forward) 5'-GGTGA CTCTGATGGCCAGTT-3' (reverse)	109 bp	

3.3.5 Software

Die statistische Analyse wurde mithilfe der Programme Graphpad 5.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) sowie IBM SPSS Statistics 22 (IBM, Armonk, NY, USA) durchgeführt, Text- und Datenverarbeitung mit den üblichen Microsoft Office Programmen. Primer wurden mit der Software Oligoanalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) analysiert. Speicherung und Auswertung der quantitativen PCR erfolgte mit dem Programm Rotor Gene 6 (Qiagen, Hilden, Deutschland). Der Cytometric Bead Array wurde mit den Programmen FCAP Array v.1.0.1, (Soft Flow Inc., Roseville, CA, USA) und Magellan 5.03 (Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich) ausgewertet.

3.3.6 Elektronische Datenbanken

Name	Internetadresse	Verwendungszweck
Primer – Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/	Primeranalyse, Sequenzinformationen
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov	Literaturrecherche, Sequenzinformationen
Wikipedia	http://www.wikipedia.org/	Freie Online Enzyklopädie

3.4 Methoden

3.4.1 Pricktest

Hauttests gehören zur Standarddiagnostik in der Abklärung von Typ-I-Allergien. Nach dem Aufbringen von standardisierten Lösungen mit den jeweils zu testenden Allergenen auf die Unterarmhaut des Patienten, erfolgte das Durchstechen der Epidermis durch den Tropfen mit einer normierten Lanzette (Tiefe 1 mm), ohne dabei eine Blutung zu verursachen. Eine in der gleichen Weise durchgeführte Positivkontrolle (1% Histamin) und eine Negativkontrolle (0,9% NaCl) dienen zum Vergleichen und Bewerten der erfolgten Quaddelbildung und der Rötung als Reaktion auf die Allergene. Die Bewertung wurde nach 20 min Wartezeit durchgeführt. Der Test wurde als positiv bewertet, wenn der Durchmesser der Reaktion eines Allergens bei negativer NaCl-Kontrolle größer als die Histaminkontrolle war. Diese musste mindestens 3 mm durchmessen. Es wurden die Allergene von Birke, Erle, Hasel, Gräser, Roggen, Beifuß, Spitzwegerich, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, Hausstaubmilben (*Dermatophagoides pteronyssinus* und *farinae*), Hundehaaren, Katzenhaaren und Pferdehaaren getestet.

3.4.2 Lungenfunktionsprüfung

Es wurden eine Spirometrie und eine Ganzkörperplethysmographie durchgeführt. Alle Messungen wurden mit dem Ganzkörperplethysmographen Master Screen Body (Viasys Health Care, Würzburg, Deutschland) durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit waren die gemessenen Werte im Verbund mit der bronchialen Provokation und dem Bronchospasmo-lysetest von Bedeutung für die Bestätigung der Diagnose Asthma bronchiale und zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs nach der Inhalation von Ciclesonid. Folgende Parameter wurden dabei erfasst:

- *Einsekundenkapazität (FEV₁)*

Die FEV₁ bezeichnet das maximale Gasvolumen, das innerhalb der ersten Sekunde der Exhalation aus maximaler Inspirationslage forciert abgeatmet werden kann. Sie ist ein Parameter zur Erfassung von Obstruktionen, kann aber auch bei restriktiven Erkrankungen erniedrigt sein.

- *Vitalkapazität (VC)*

Die Vitalkapazität entspricht dem gesamten Gasvolumen, das nach maximaler Inspiration abgeatmet werden kann. Sie ist ein Maß für die Atembreite, i.e. für das mobilisierbare Lungenvolumen und ist typischerweise bei restriktiven Erkrankungen erniedrigt.

- *Tiffeneau-Index (TI)*

Der Quotient aus FEV_1 und Vitalkapazität (VC) in Prozent wird als Tiffeneau-Index (TI) bezeichnet. Ein erniedrigter TI weist auf eine Erkrankung mit obstruktiver Komponente hin. Bei restriktiven Erkrankungen ist der TI normal oder erhöht.

- *Spezifischer totaler Atemwegswiderstand (sR_{tot}) nach Ulmer*

Der spezifische Atemwegswiderstand (sR_{tot}) ist ein sensibler Parameter zur Erfassung von peripheren Obstruktionen. Der Parameter kann weitgehend unabhängig von der Mitarbeit des Patienten gemessen werden.

3.4.3 Bronchiale Provokation

Zum Nachweis einer bronchialen Hyperreagibilität (BHR) wurde bei V-1 und 1 ein bronchialer Provokationstest durchgeführt. Die Provokation erfolgte mit 3,2%igem Methacholin, das in der hauseigenen Klinikapotheke hergestellt wurde. Nach Durchführung der standardmäßigen Lungenfunktion inhalierte der Patient zunächst über 2 Minuten 0,9% NaCl, im Anschluss über maximal 8 Stufen in steigender Dosierung Methacholin. Nach jeder Stufe wurde erneut der sR_{tot} gemessen. Bei einem Anstieg der sR_{tot} über $2 \text{ kPa} \times \text{s}$ und um über 100% des individuellen Sollwertes wurde der Test abgebrochen und als positiv bewertet. Zur Aufhebung der eingetretenen Obstruktion wurden nach Beendigung des Tests p.i. 400 μg Sultanol verabreicht.

3.4.4 Bronchospasmolyse

Die Bronchospasmolyse wurde bei V0 im Anschluss an den Lungenfunktionstest durchgeführt. Der Patient inhalierte 400 µg Sultanol und nach 10 Minuten wurden erneut FEV₁, VC und sRtot gemessen um die Reversibilität einer eventuell vorliegenden Obstruktion zu überprüfen. Eine Erhöhung der FEV₁ um mehr als 200 ml und um 12 % wurde als Hinweis für das Vorliegen einer obstruktiven Ventilationsstörung interpretiert.

3.4.5 Induziertes Sputum

Die Induktion von Sputum ist eine bewährte, risikoarme Methode um Zellmaterial aus den kleinen Atemwegen zu gewinnen. Unser Vorgehen entsprach weitestgehend dem Protokoll von Pavord et al.⁹⁸ Zur Verminderung des Risikos eines Bronchospasmus durch die Inhalation von hypertoner Kochsalzlösung wurde zusätzlich ein Inhalationsschritt mit isotoner Kochsalzlösung vorgeschaltet. Nach Inhalation von 200 µg Salbutamol atmeten die Patienten für je 5 Minuten vernebelte, frisch angesetzte 0,9%, 3%, 4% und 5% Kochsalzlösung ein.

Die Verneblung erfolgte mittels Ultraschallvernebler (LS 290, Flores medical, Probstzella, Deutschland) mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min. Nach jeder Inhalation wurden die Patienten aufgefordert, Sputum in eine Petrischale (Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) zu expektorieren. Sputumflocken wurden aus dem Expektorat herausgesammelt. Pro Gramm Sputum wurden der Probe 4 ml 0,1% Dithiothreitol und nach Dispersion des Sputums durch kurzes vortexen und 15 Minuten auf dem Rollmischer die gleiche Menge PBS hinzugefügt. Die Suspension wurde durch eine mit PBS befeuchtete Nylongaze (Maschengröße 50-53 µm, Sefar Holding AG, Heiden, Schweiz) filtriert, die Zellzahl und der Anteil vitaler Zellen mittels Neubauer Zählkammer und Färbung mit 10 µl Trypanblau mikroskopisch bestimmt.

Das Filtrat wurde bei 450 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in einem der vitalen Zellzahl proportionalen Volumen PBS resuspendiert.

Im Cytospin wurden für 6 min bei 450 rpm je 3 Objektträger mit 200 µl und 100 µl der Suspension beschickt, dann für 30-60 Minuten an der Luft getrocknet. Im Anschluss erfolgte die Färbung je eines Präparates mit 200 µl und eines mit 100 µl nach Pappenheim sowie mit dem Fertigkit Rapi Diff II Stain Pack (Atom Scientific Ltd., Manchester, England) nach den Vorgaben des Herstellers. Die übrigen beiden Präparate wurden nicht gefärbt. Zum Schutz der Zellen wurden die Präparate mit Deckgläsern versiegelt. Für die Bestimmung der Zellfraktionen wurde nach Kriterien der Mikroskopierbarkeit das beste Präparat ausgewählt und bei 100 -facher Vergrößerung mit Ölimmersion mikroskopiert. Es wurden 500 Zellen ausgezählt, dabei wurden nur solche Zellen gewertet, die aufgrund ihrer spezifischen Merkmale eindeutig einer bestimmten Zellpopulation zuzuordnen waren. Es wurden Makrophagen, Epithelzellen, Lymphozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten berücksichtigt.

3.4.6 Isolierung CD3⁺ Zellen aus peripherem Blut

Probengewinnung und -vorbereitung





Die Blutabnahme erfolgte durch Punktion einer peripheren Unterarmvene, das Blut wurde am Vormittag abgenommen und innerhalb einer halben Stunde weiterverarbeitet.

Pro Patient wurden bei V-1 und V1 je 65,6 ml EDTA-Blut in 7 Röhrchen zu 9 ml und einem Röhrchen mit 2,6 ml abgenommen. Die Proben wurden nach Blutabnahme 10 Minuten auf den Rollenmischer gegeben. Aus 5 Röhrchen und 45 ml EDTA-Blut erfolgte die Isolierung der CD3⁺ Zellen. Jedes der 9 ml Röhrchen wurde in ein 50 ml FalconTM-Tube überführt und mit 26 ml Puffer mit 0,5% BSA gemischt. Anschließend wurden 15 ml Ficoll-PaqueTM mit den 35 ml des Blut-Puffer-Gemisches überschichtet. Durch Dichtezentrifugation (400 g für 40 Minuten bei 20 °C ohne Bremsen) wurden die Mononukleären Zellen (PBMCs) in einer eigenen Phase isoliert, mit einer Einmalpasteurpipette abgenommen und in ein neues 50 ml FalconTM Tube überführt. Die so gewonnen PBMCs wurden anschließend mit Puffer in ein Volumen von 50 ml verdünnt und wieder zentrifugiert (300 g für 10 Minuten bei 20 °C).

Durch zwei weitere Waschschritte (200 g für 10 Minuten bei 20 °C) wurde die Verunreinigung durch Thrombozyten vermindert. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl Puffer resuspendiert und der Separation im autoMACS® zugeführt.

Isolation CD3⁺ Zellen aus PBMCs mithilfe des AutoMACS®

Der AutoMACS® führt ein sogenanntes „magnetic cell sorting“ an den PBMCs durch. Nicht-CD3⁺ Zellen wurden primär mit einem Mix aus biotinylierten Antikörpern und sekundär mit an paramagnetische Microbeads gebundenen Biotin-Antikörpern markiert und in einem magnetischen Feld von den CD3⁺ Zellen separiert. Somit wurden unberührte CD3⁺ T-Lymphozyten gewonnen. Die gesortete Suspension wurde zentrifugiert, die CD3⁺ Zellen in 5 ml PBS resuspendiert und 5 µl abgenommen, um die Zellzahl im CASY® Cell Counter zu bestimmen. Je 1 ml der Suspension wurde anschließend in 5 RNase-freie 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Mittels Durchflusszytometrie wurde am Beginn der Versuchsreihe der Reinheitsgrad der CD3⁺ Zellen im Isolat bestimmt, dieser betrug 99%. Die Zellen eines Reaktionsgefäßes wurden für spätere Versuche eingefroren. Mit den anderen vier Reaktionsgefäßen wurde nach folgendem Schema verfahren:

 Isolierung der intrazellulären RNA	 Proteinisolation nach Zellwandlyse	 Aktivierung über Nacht, anschließend Abnahme des Überstandes nach Zentrifugation und Isolierung der intrazellulären RNA	 Aktivierung über Nacht, anschließend Abnahme des Überstandes nach Zentrifugation und Proteinisolation nach Zellwandlyse
---	---	--	--

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zytokinexpression auf Proteinebene im Überstand und auf RNA-Ebene untersucht.

3.4.7 Aktivierung der CD3⁺ Lymphozyten

Die Aktivierung von Lymphozyten wird durch einen Mix von biotinylierten CD2-, CD3- und CD28-Antikörpern (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) erreicht. Durch paramagnetische Partikel mit einem Durchmesser von 3,5 µm (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) wird die Aktivierung noch verstärkt. Durch die kovalente Bindung von Biotin-Antikörpern an die Partikel werden diese zunächst mit den biotinylierten Antikörpern beladen und anschließend der Zellsuspension beigegeben. Durch Bindung der Antikörper an die jeweiligen Rezeptoren und die so hergestellte Nähe der Partikel zu den CD3⁺ Zellen kann die zusätzliche Stimulation ausgelöst werden. Diese imitiert die Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen.

Die Beladung der Partikel mit biotinylierten Antikörpern und die Stimulation erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers.

Beladung der Partikel mit Antikörpern

Je 100 µl der biotinylierten CD2-, CD3- und CD28-Antikörperlösungen wurden in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert. Die Anti-Biotin MACSiBeadTM Partikel (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) wurden gevortext, 10⁸ Partikel in 500 µl abgenommen und dem Antikörpermisch zugegeben. Anschließend wurden 200 µl Rinsing Solution mit 0,5% HSA hinzupipettiert, das Gemisch für 2 Stunden auf dem Platform Rotator bei 4 °C mit langsamer Geschwindigkeit inkubiert und danach bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Inkubation der CD3⁺ Lymphozyten

Per 10⁶ Zellen wurden 5 µl der beladenen MACSiBeadsTM nach erneutem Resuspendieren abgenommen, in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 400 µl RPMI 1640 hinzugefügt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation der Partikel für 5 Minuten bei 300 g. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und 200 µl RPMI 1640 mit 10% AB-Serum zugegeben.

Die beiden Reaktionsgefäße mit den Lymphozyten wurden bei 340 g für 10 Minuten zentrifugiert, die Zellen anschließend in jeweils 900 µl RPMI 1640 mit 10% AB-Serum aufgenommen. Den Zellen wurde der Zellzahl entsprechend beladene Partikel zugegeben, so dass das Verhältnis von Lymphozyten zu Partikeln 2:1 betrug. Die Zellen wurden dann in zwei Wells einer 24-Well Platte gegeben und für 16 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellsuspensionen aus den beiden Wells in je ein Reaktionsgefäß überführt, von beiden wurde nach Zentrifugation (340 g, 10 Minuten bei Raumtemperatur) der Überstand abpipettiert und bei -80 °C eingefroren. Aus einem der beiden Zellpellets wurde die RNA extrahiert.

3.4.8 Molekularbiologische Methoden

3.4.8.1 Vorbemerkungen zum Arbeiten mit RNA und DNA

Ribonukleinsäure an sich ist ein relativ stabiles Molekül, es ist jedoch von der Zersetzung durch die sehr aktiven und stabilen RNasen bedroht. Alle Arbeiten wurden daher unter weitestgehend sterilen Bedingungen durchgeführt um Degradationen zu vermeiden. RNasen befinden sich sowohl auf der Haut als auch im Staub. Wichtig ist daher ein sauberer und RNase freier Arbeitsplatz. Es wurden stets gestopfte Pipettenspitzen verwendet und mit sauberen Handschuhen gearbeitet. Arbeitsgeräte und der RNA Arbeitsplatz wurden vor Beginn der Arbeit mit Ethanol behandelt. Soweit möglich fanden die Arbeiten in einer Clean Bench statt. Bei Verdünnungsschritten wurde speziell RNase und DNase freies Wasser verwendet.

Beim Arbeiten mit DNA steht mehr die Vermeidung von Kontaminationen der Proben im Vordergrund. Außer dem Arbeiten unter der Clean Bench entsprachen die Bedingungen denen der Arbeit mit RNA.

3.4.8.2 RNA-Isolation aus CD3⁺ Lymphozyten

Prinzip

Die RNA-Isolation erfolgte mithilfe des RNeasy Kit. Nach Zellwandlyse wird das Lysat auf eine Silikamembran gegeben. Die negativ geladene RNA bindet an der Membran, andere Bestandteile des Zelllysats werden mit verschiedenen Waschpuffern entfernt und letztlich wird die gebundene RNA in Wasser eluiert.

Durchführung

Die suspendierten, stimulierten oder unstimulierten Zellen wurden für 10 Minuten bei 340 g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in 350 µl RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol zur Zellwandlyse aufgenommen. Bis zur Weiterverarbeitung am nächsten Tag wurden die lysierten Zellen bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden dem Zelllysats weitere 350 µl Ethanol hinzugefügt und die Probe anschließend auf eine Mini Säule pipettiert und dann für 1 min bei 6200 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, 700 µl RW1 Puffer auf die Säule pipettiert, die Säule erneut bei 6200 g zentrifugiert und der Durchlauf erneut verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 µl RPE Puffer, wobei beim ersten Waschschrte 1 Minute mit 6200 g zentrifugiert wurde, beim zweiten 2 Minuten mit 16000 g. Die leere Säule wurde 1 Minute erneut bei 16000 g zentrifugiert. Zur Eluation der in der Säule befindlichen RNA wurde 30 µl RNase freies Wasser auf die Säule gegeben und die Säule bei 16000 g für 1 Minute zentrifugiert. Anschließend wurde das Wasser erneut auf die Säule gegeben und die Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wiederholt.

3.4.8.3 Quantifizierung der Gesamt-RNA

Die Konzentration der RNA im Eluat wurde durch Absorptionsspektrometrie bestimmt. Dem Eluat wurden 1,5 µl entnommen und die optische Dichte (OD) bei 260 nm mit dem Nanodrop 2000 (Thermoscientific, Waltham, MA, USA) gemessen. In Stichproben wurde auch die OD bei 280 nm gemessen, der Quotient OD_{260}/OD_{280} ist ein Maß für die Verunreinigung der Probe mit Proteinen und sollte zwischen 1,5 und 2,2 liegen. Anschließend wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren.

3.4.8.4 DNase I Verdau

Bei der Polymerase-Kettenreaktion können Verunreinigungen mit genomischer DNA in der Probe zu falsch positiven Ergebnissen führen. Durch einen DNase I Verdau wird DNA in der Probe degradiert, amplifizierbare Sequenzen werden so minimiert. Es wurden die Reagenzien des DNase I Kits verwendet und mit Modifikationen nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

Von der isolierten RNA jedes Patienten wurden 250 ng in 10 µl Wasser mit je 1 µl DNase Puffer und DNase I in einem RNase freien 0,5 ml PCR Tube vermischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1 µl EDTA hinzugefügt und die Lösung 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Direkt im Anschluss wurde die cDNA-Synthese durchgeführt.

3.4.8.5 cDNA-Synthese

Die complementary DNA (cDNA) wird durch reverse Transkription hergestellt. mRNA ist an seinem 3'-Ende polyadenyliert, ein dem Poly-A-Schwanz komplementärer Primer kann deshalb bei einer Länge der interessierenden mRNA von unter 2000 Basen dazu verwendet werden, diese vollständig in cDNA zu transkribieren.

Es wurde zunächst ein Master Mix erstellt, für jede Probe wurden 2 µl RT-Puffer und 2 µl dNTPs aus dem Omniscript RT Kit, 1 µl Oligo dT 18 Primer mit einer Konzentration von 50 pmol/µl und 1 µl RNase freiem Wasser vermischt. Es wurden 6 µl des Master Mix und anschließend 1 µl der reversen Transkriptase jeder Probe zugefügt. Dann wurden die Proben im Biometra TRIO Thermalblock (Biometra, Göttingen, Deutschland) für 60 Minuten bei 37 °C, 5 Minuten bei 93 °C und bis zur Entnahme der Tubes bei 4 °C inkubiert. Die fertige cDNA wurde bis zur Durchführung der quantitativen PCR bei -20 °C gelagert.

3.4.8.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion gehört zu den bedeutendsten Methoden der Molekularbiologie. Durch Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz auf einige Millionen Kopien kann diese bei entsprechendem Versuchsaufbau qualitativ oder quantitativ nachgewiesen werden, bis zu 10 Kopien einer Sequenz in der Probe sind noch sensitiv quantitativ nachweisbar, qualitativ sogar noch weniger.

Klassischerweise besteht die PCR aus mehreren Zyklen der drei Phasen Denaturierung, Anlagerung der Oligonukleotidprimer („Annealing“) und Extension, die durch unterschiedliche Temperaturen charakterisiert sind. Am Anfang steht die Denaturierung der cDNA in ihre beiden Einzelstränge bei 95 °C. Zwei jeweils im Überschuss vorhandene Oligonukleotidprimer sind dem jeweiligen 3'-Ende des Sense- und des Antisense-Stranges der Zielsequenz komplementär.

Beim Annealing hybridisiert der so genannte „forward“-Primer an den Sense-Strang, der „reverse“-Primer an den Antisense-Strang und so ermöglichen sie den Beginn der Synthese der jeweils komplementären Nukleotidsequenz durch die Polymerase. Die Temperatur $T_{\text{Annealing}}$, bei der dieser Schritt optimalerweise stattfindet, ist eine Funktion der Schmelztemperaturen von Primern und Produkten. In der dritten Phase erfolgt die Verlängerung der Sequenz bei 72 °C, die verwendeten Polymerasen haben bei dieser Temperatur ihr Arbeitsoptimum.

Die Taq-Polymerase arbeitet stets in 3'→5'-Richtung, im ersten Zyklus synthetisiert die Polymerase vom jeweiligen Primer beginnend einen der Vorlage komplementären DNA-Strang. Im zweiten Zyklus bindet der jeweils gegenläufige Primer an das 3'-Ende der Zielsequenz auf dem synthetisierten Strang, die Polymerase baut erstmals die gewünschte Zielsequenz. Diese dient wiederum als Matrize und erfährt im Verlauf eine exponentielle Vermehrung. Üblicherweise werden zwischen 30 und 40 Zyklen durchgeführt. Den Zyklen wird eine etwa fünfminütige Phase bei 95 °C vorgeschaltet, in der die cDNA vollständig denaturiert wird und die Aktivierung der thermostabilen Taq-Polymerase erfolgt.

Folgendes Programm war Grundlage aller durchgeführten PCRs:

95 °C für 5 Minuten
40 Zyklen: [95 °C für 30 Sekunden,
59 °C für 30 Sekunden,
72 °C für 30 Sekunden]

Die Primer wurden so gewählt, dass $T_{\text{Annealing}}$ stets bei 59 °C lag um die Durchführung zu erleichtern. Als Ausgangs-DNA für die qualitative PCR und als Kalibrator für die quantitative PCR wurde die cDNA eines gesunden Probanden verwendet. Dafür wurde Gesamt-RNA nach oben beschriebenen Methoden aus aktivierten CD3⁺ Lymphozyten gewonnen und bei einer Konzentration von 50 ng/μl in cDNA umgeschrieben.

3.4.8.7 Primerdesign

Während drei der Primerpaare einschließlich des Housekeeping Gens (HKG) bereits bei einer anderen Arbeitsgruppe etabliert waren und übernommen werden konnten, mussten die übrigen Primer ausgetestet werden. Die Primersequenzen wurden aus vorhandenen Publikationen entnommen.

Um gute Ergebnisse zu erzielen, sollten die Primer zwischen 15 und 25 Nukleotiden lang sein. Es wurde darauf geachtet, dass die Primer eine Exon-Exon Grenze umspannen, um Verunreinigungen durch genomische DNA zu erkennen beziehungsweise zu vermeiden. Da bei genomischer DNA das Intron noch zwischen den Exons liegt, würde ein Produkt sehr lang werden oder gar nicht amplifiziert werden. Das Amplikon sollte kleiner als 200 bp sein, der GC-Gehalt 40-60% betragen und die Primer eine einheitliche günstige Annealing-Temperatur besitzen.

3.4.8.8 Qualitative PCR

Die qualitative PCR diente in erster Linie zur Testung der Funktionstüchtigkeit von in Publikationen gefundenen Primern. Als Template wurde die cDNA eines gesunden Probanden verwendet.

Für jedes Zielgen wurde der folgende Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl pipettiert.

12,5 µl RedTaq PCR Reaction Mix
1 µl Forward Primer (6,25 pmol/µl)
1 µl Reverse Primer (6,25 pmol/µl)
8,5 µl H₂O bidest.
2 µl cDNA

Die anschließende PCR fand nach oben genannten Standardbedingungen im Thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) statt. Im Anschluss an das Programm wurden die Proben im Cycler bis zur Durchführung der Gelelektrophorese bei 10 °C gekühlt.

3.4.8.9 Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können in einer Agarosematrix bei angelegter Spannung aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung der Anode wandern. Kürzere Fragmente wandern schneller als größere. Lässt man parallel DNA-Fragmente unterschiedlicher bekannter Größe (DNA-Leiter) mitlaufen, kann man die Länge der zu untersuchenden DNA ablesen.

Zur Visualisierung wird häufig Ethidiumbromid verwendet, das nach Interkalation in doppelsträngiger DNA durch UV-Strahlung zum Fluoreszieren angeregt werden kann.

Da relativ kleine Fragmente untersucht werden sollten, wurde aus 6 g Agarose, 5 µl Ethidiumbromid und 200 ml 1x Tris-Borat-EDTA (TBE) ein 3%iges Gel erstellt. In einer Elektrophorese Kammer wurde das Gel mit 1x TBE Puffer bedeckt und für etwa 30 Minuten eine Spannung von 120 Volt angelegt. Anschließend wurde die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und abgelichtet.

3.4.8.10 Quantitative PCR

Eine Weiterentwicklung der klassischen PCR stellt die Real-Time quantitative PCR dar. Dem Reaktionsansatz kann beispielsweise zusätzlich ein Interkalator zugegeben werden, der sich in neu synthetisierter doppelsträngiger DNA einlagert und dann durch UV-Licht zum Leuchten angeregt werden kann. Die emittierte Signalstärke ist proportional zur kumulativen, amplifizierten Produktmenge. Mithilfe einer CCD-Kamera kann die Lichtstärke nach jedem Zyklus gemessen und mit entsprechender Software in Echtzeit dargestellt werden. Die Zykluszahl, bei der sich die so ermittelten Fluoreszenzkurven erstmals vom Hintergrundsignal abheben, bezeichnet man als threshold cycle (C_T). Dieser lässt einen Rückschluss auf die Templatemenge zu.

Relative Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Ergebnisse gibt es unterschiedliche Strategien. In der vorliegenden Arbeit wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewandt. Hierbei werden die C_T -Werte der Zielgene zunächst mit dem C_T -Wert eines endogenen, stets gleich exprimierten Gens normalisiert und anschließend in Abhängigkeit von den Werten eines Kalibrators angegeben. Als endogene Kontrolle wurde das Housekeeping Gen Ribosomal Protein L32 (RPL32) gewählt. Die $\Delta\Delta C_T$ -Methode geht von einer etwa gleich großen Effizienz der Zielgenprimer und der Primer des HKGs aus. Daher wurden diese mithilfe von Verdünnungsreihen nachgewiesen.

Durchführung

Die Messungen wurden mit dem Rotor Gene 3000 (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Aufzeichnung der Fluoreszenzkurven und die Ermittlung der C_T -Werte erfolgte mit dem Programm Rotor Gene 6 (Qiagen, Hilden, Deutschland). Als Fluoreszenzfarbstoff wurde das interkalierende SYBR Green I gewählt. Der Ansatz für die PCR umfasste 10 μ l und setzte sich wie folgt zusammen:

- 5 μ l SYBR Green Master Mix
- 0,4 μ l Forward Primer (Konzentration = 6,25 pmol/ μ l)
- 0,4 μ l Reverse Primer (Konzentration = 6,25 pmol/ μ l)
- 3,2 μ l H₂O
- 1 μ l cDNA (in einer Verdünnung von 1:4)

Die Pipettierung des Ansatzes erfolgte auf einer speziellen vorgekühlten Platte und wurde im Anschluss direkt der PCR zugeführt.

3.4.8.11 Proteinquantifizierung: Cytometric Bead Array (CBA)

Im Überstand der stimulierten Zellen wurden mittels CBA-Flex-Cytometrie mit dem BD FACSArray Bioanalyzer (BDBioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) u.a. die Proteine IL 4, IL 5, IL 6, IL 10, IL 13, und IL 17A quantitativ bestimmt. Als Zytokinstandards wurden 13 Verdünnungen von 0 bis 10 000 pg/ml verwendet.

Ein Vorteil des CBA ist, dass pro Well aus einer Probe 10 verschiedenen Zytokine gemessen werden können. Es wurden auch 10 verschiedenen Zytokine untersucht. Da die RNA-Ausbeute jedoch zu gering war um entsprechende Zytokinkonzentrationen auch auf RNA-Ebene zu untersuchen, entschieden wir uns, im Rahmen dieser Arbeit nur 6 Zytokine zu betrachten und die entsprechenden Zytokine auch auf RNA-Ebene zu untersuchen. IL-4 wies auf Proteinebene keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten auf und wurde daher auf RNA-Ebene nicht untersucht, aufgrund seiner bereits nachgewiesenen Bedeutung bei T_H2-medierten Pathomechanismen sollen die Ergebnisse trotzdem vorgestellt werden. Es wurden also 10 verschiedene Arten von Latexpartikeln ($\varnothing \approx 7,5 \mu\text{m}$) verwendet, die zum einen bei Anregung durch einen Laser ein spezifisches Fluoreszenzmuster aufweisen und so in der Durchflusszytometrie voneinander differenziert werden können, und zum anderen mit spezifischen Antikörpern gekoppelt sind und die zu untersuchenden Zytokine binden. Nach Zugabe des Überstandes bzw. des Zytokinstandards wurde außerdem der an zytokinspezifische Antikörper gekoppelte Farbstoff Phycoerythrin (PE) zugegeben, der an die konjugierten Proteine bindet. PE wird von einem Laser (532 nm Wellenlänge) angeregt und emittiert Licht mit einem Hauptpeak bei 585 nm Wellenlänge. Je nach Menge der PE-gekoppelten Sekundärantikörper kann eine korrelierende Fluoreszenzintensität gemessen werden, die wiederum im Bezug auf den Zytokinstandard eine Aussage über die Konzentration des zu untersuchenden Zytokins zulässt. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

3.4.9 Statistische Methoden

Die Daten wurden mithilfe des D'Agostino & Pearson omnibus normality test auf Normalverteilung getestet. Bei ungepaarten Daten wurde bei einem positiven Ergebnis der Students t-test durchgeführt beziehungsweise bei mehr als 2 Kohorten eine ANOVA. Bei einem negativen Ergebnis oder ordinal skalierten Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test oder bei mehr als zwei Kohorten der Kruskal-Wallis-Test mit Post-Hoc-Testung verwendet. Gepaarte, normalverteilte Daten wurden mit einem gepaarten t-test geprüft, nicht normalverteilte und ordinal skalierte mit dem Wilcoxon Matched-Pairs Signed Rank Test. Bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ wurde das Ergebnis als statistisch signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Kohorten

In die 4 Kohorten konnten unter Beachtung der in 3.2.1 genannten Ein- und Ausschlusskriterien 9 eosinophile Asthmatiker (EA), 11 nichteosinophile Asthmatiker (NEA), 10 allergische Rhinitiker (AR) und 10 Gesunde in die Kontrollgruppe aufgenommen werden. Da gemäß den Einschlusskriterien Studienteilnehmer steroidnaiv sein mussten, nahmen hauptsächlich Patienten mit intermittierendem und mildem Asthma an der Studie teil. Die Zuteilung der Schweregrade erfolgte anhand der Anamnese, der Lungenfunktion sowie den verwendeten Fragebögen (AQLQ und ACQ-5) nach den GINA-Guidelines.¹ Dabei wurden von den NEA 5 als intermittierend, 5 als mild persistierend und 1 als mittelschwer persistierend, von den EA 2 als intermittierend und 7 als mild persistierend klassifiziert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Variablen Geschlecht, Alter und BMI zwischen den Kohorten. Sofern nicht anders angegeben, wurden stets die arithmetischen Mittelwerte angeführt (siehe Tabelle 1).

Kohorte Variable	EA (n=9)	NEA (n= 11)	Allergische Rhinitiker (n=10)	Gesunde (n=10)
Weibliches Geschlecht , %	55,6	63,6	40	80
Alter, Jahre (SD)	31 (12,1)	35 (15)	35 (11)	34 (10,6)
BMI, kg/m ² (SD)	26,3 (5,7)	24,1 (1,9)	23,8 (2,9)	23 (3,5)
Asthmaschweregrad, Anzahl interm./mild/mittelschwer	2/7/0	5/5/1	-	-

Tabelle 1: Demographische und klinische Daten der Kohorten bei Visite -1; SD = Standardabweichung

4.2 Ergebnisse bei Visite -1 und Visite 0 – Darstellung und Vergleich der Asthmatiker- und Nichtasthmatikergruppen

4.2.1 Induziertes Sputum und Pricktest

Definitionsgemäß wurden in unserer Studie Asthmatiker als eosinophil eingestuft, wenn der Anteil der eosinophilen Granulozyten zu den Zeitpunkten V-1 und V0 bei >3% lag. Alle anderen Asthmatiker wurden als nicht-eosinophil klassifiziert. Ausgeschlossen wurden Asthmatiker mit instabiler Eosinophilie. NEA werden nach Simpson et al. weiter in paucigranulozytäre, und neutrophile Asthmatiker (Anteil der Neutrophilen > 61%) unterteilt.¹¹² In unserer Studie waren nach dieser Klassifikation (siehe auch Kap. 2.2.4) 10 der 11 NEA dem paucigranulozytären Subtyp mit unauffälligen Granulozytenfraktionen zuzuordnen, nur ein Patient hatte einen zu allen Zeitpunkten erhöhten Neutrophilenanteil.

Bei einem durchgeführten standardisierten Pricktest (siehe 3.4.1) zeigten 9 der 11 NEA, 9 von 9 EA, 3 der 10 gesunden Kontrollpersonen und 10 der 10 Rhinitiker ein positives Ergebnis.

4.2.2 Lungenfunktion

Die Lungenfunktion war Bestandteil jeder Visite, stets wurden die Basisparameter FEV₁, VC, TI und SR_{tot} gemessen. Bei Visite -1 wurde zusätzlich eine bronchiale Provokation durchgeführt, bei Visite 0 ein Bronchospasmodolysetest mit Salbutamol. Hierbei wurde die FEV₁ vor und nach Applikation von Salbutamol bestimmt und die Differenz errechnet (Δ FEV₁)

EA und NEA unterschieden sich bei Erstvorstellung hinsichtlich des Medians der erreichten Stufe der Provokation (EA: 3 vs. NEA: 7; $p = 0,004$). Alle anderen Parameter der EA und NEA bei den ersten beiden Visiten unterschieden sich nicht statistisch signifikant. Erwartungsgemäß unterschieden sich die Lungenfunktionsparameter der EA und der NEA von der Kontrollgruppe (FEV₁, % des Sollwertes: $p = 0,002$ bzw. $p = 0,049$; TI: $p = 0,002$ bzw. $p = 0,039$).

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt.

Kohorte Variable	Eosinophile (n=9)	Nicht- Eosinophile (n= 11)	Allergische Rhinitiker (n=10)	gesunde Kontrollen (n=10)
FEV ₁ , % des Sollwertes (SD)	84,8 (12,5) ⁺	92,3 (9,8) ⁺	103,2 (10,3)	104,2 (10)
TI, % (SD)	84 (10,8) ⁺⁺	90 (12,2) ⁺⁺	97,7 (11,9)	102,6 (7,5)
sRtot, % des erwarteten Wertes (SD)	129,6 (36,9)	114,3 (66,4)	94,3 (24,9)	98,8 (24,4)
Stufe des Abbruchs der Provokation (Median) *	3 ⁺⁺⁺	7 ⁺⁺⁺	-	-
Provokation positiv *	9/9	10/10	0/10	0/10

Tabelle 2: Lungenfunktion bei Visite -1 (V-1); signifikante Ergebnisse sind mit (*) markiert, stets im Vergleich mit den gesunden Kontrollen

⁺ EA p = 0,02; NEA p = 0,049; ⁺⁺ EA p = 0,02; NEA p = 0,039; ⁺⁺⁺ EA vs. NEA p = 0,004

* Bei einem Patienten (NEA) wurde keine bronchiale Provokation durchgeführt, da der sRtot bereits vor Beginn der Provokation bei über 3 kPa × s lag

	EA (V0) n=9	NEA (V0) n=11
FEV ₁ , % des Sollwertes (SD)	87,4 (13,3)	90 (16)
TI, % (SD)	86,1 (12)	90,1 (11,5)
SRtot, % (SD)	126,4 (46,9)	122,1 (47,7)
ΔFEV ₁ nach Broncho- dilator, % (SD)	10,5 (6,1)	9,2 (5,4)

Tabelle 3: Lungenfunktion bei Visite 0 (V0)

4.2.3 Molekularbiologische Messungen

Bei Visite -1 wurden aus dem peripheren Blut wie in 3.4.6 beschrieben CD3⁺ Zellen isoliert und ein Teil von diesen aktiviert. Aus dem Überstand der aktivierten Zellen wurden mittels Cytometric Bead Array die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 und IL-17A bestimmt, aus den aktivierten und nicht-aktivierten Zellen die RNA isoliert und diese mittels PCR quantitativ auf die oben genannten Zytokine analysiert.

Bei einem gesunden Probanden und einem EA konnten aufgrund von technischen Problemen im Verlauf der Probengewinnung keine Zytokinkonzentrationen im Überstand gemessen werden, sodass nur von 8 EA, 11 NEA, 10 Rhinitikern und 9 gesunden Kontrollen Proben analysiert wurden. Bei der Quantifizierung der RNA aus den aktivierten Zellen konnte aufgrund von technischen Schwierigkeiten oder wegen zu geringer RNA Ausbeute bei 2 EA, 1 NEA und einer gesunden Kontrollperson keine quantitative PCR durchgeführt werden. Letztlich wurden bei 7 EA, 10 NEA, 10 Rhinitikern und 9 gesunden Probanden Messungen durchgeführt.

Die Zytokinexpression der vier Gruppen wurde mittels ANOVA („analysis of variances“) auf signifikante Unterschiede hin überprüft, bei Signifikanz wurden die Kohorten im Anschluss mittels post-hoc Analyse paarweise auf Signifikanz hin getestet.

4.2.3.1 Messung der Zytokinexpression von nicht-aktivierten $CD3^+$ Zellen

Die zu untersuchende Zytokin-RNA war in allen untersuchten Proben so gering exprimiert, dass eine sensitive Quantifizierung durch die angewendete PCR-Methode nicht möglich war.

4.2.3.2 Messung der Zytokinexpression von aktivierten $CD3^+$ Zellen

a) Interleukin 4

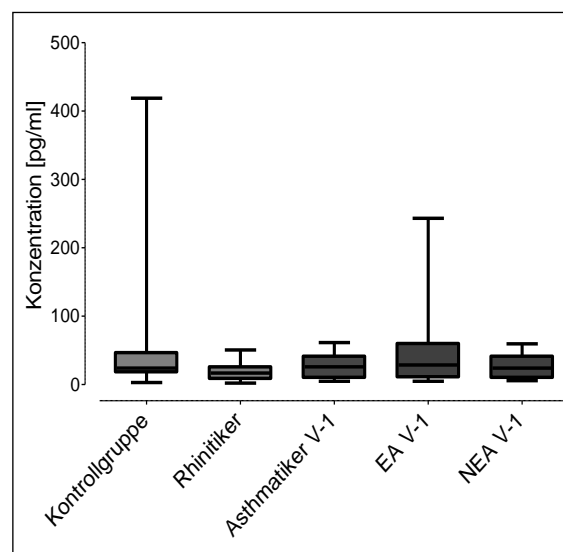


Abbildung 4: IL-4-Konzentration im Überstand der aktivierten $CD3^+$ Zellen

Asthmatiker V-1 = EA V-1 und NEA V-1

Die Expression von IL-4 wurde nur auf Proteinebene untersucht, wobei sich mittels ANOVA kein signifikanter Unterschied zwischen EA ($55,76 \pm 78,5$ pg/ml), NEA ($26,72 \pm 16,92$ pg/ml), Rhinitikern ($19,59 \pm 14,96$ pg/ml) und der Kontrollgruppe ($25,37 \pm 16,33$ pg/ml) zeigte ($p = 0.444$).

b) Interleukin 5

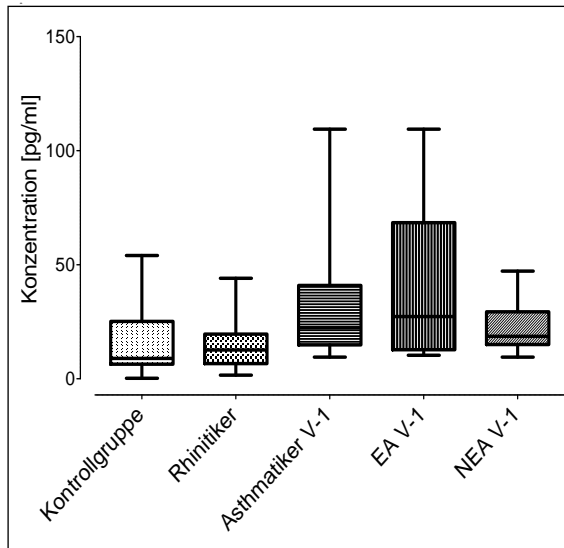


Abbildung 6: IL-5-Konzentration im Überstand der aktivierten $CD3^+$ Zellen
 Astmatiker V-1 = EA V-1 und NEA V-1
 ANOVA: $p = 0,044$

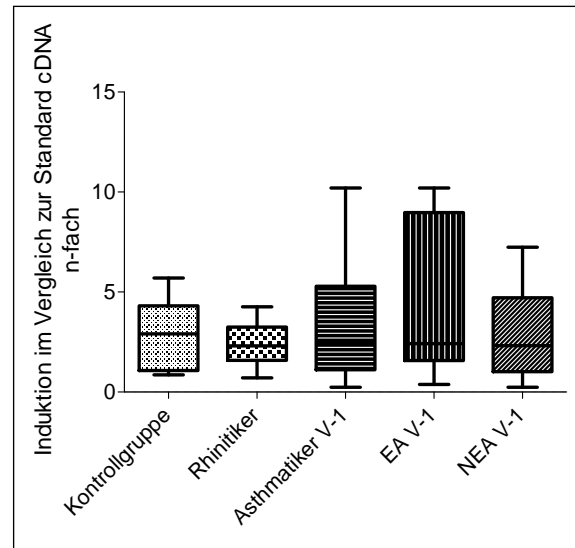


Abbildung 5: Quantitative Bestimmung der IL-5-RNA aktivierter $CD3^+$ Zellen
 Astmatiker V-1 = EA V-1 und NEA V-1

Proteinmessung im Überstand (Abbildung 5)

Im Überstand der aktivierten Zellen der Astmatiker fand sich eine mittlere IL-5-Konzentration von $30,61$ pg/ml ($SD = 25,34$), bei der Kontrollgruppe und der Rhinitikergruppe zeigten sich mittlere Konzentrationen von $15,84 \pm 16,83$ pg/ml und $14,8 \pm 11,92$ pg/ml. Der ANOVA-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen EA, NEA, Rhinitikern und Kontrollen ($p = 0,044$). Tendenziell fand sich bei den Astmatikergruppen eine erhöhte Expression des Proteins.

In den post-hoc Analysen fanden sich keine signifikanten Unterschiede bei Paarvergleichen zwischen EA und NEA ($40,71 \pm 35,44$ pg/ml vs. $23,27 \pm 11,64$ pg/ml; $p = 1,00$), zwischen EA und der Kontrollgruppe ($p = 0,152$), zwischen NEA und der Kontrollgruppe ($p = 0,374$) sowie zwischen Rhinitikern und der Kontrollgruppe ($p = 1,00$). Es bestehen also signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, diese Unterschiede konnten jedoch keinem bestimmten Paar zugeordnet werden.

RNA-Quantifizierung (Abbildung 6)

Bei der quantitativen Messung der RNA zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den EA ($4,14 \pm 3,85$), NEA ($2,86 \pm 2,4$), Rhinitikern ($2,42 \pm 1,12$) und der Kontrollgruppe ($2,71 \pm 1,9$; $p = 0,9344$).

c) Interleukin 6

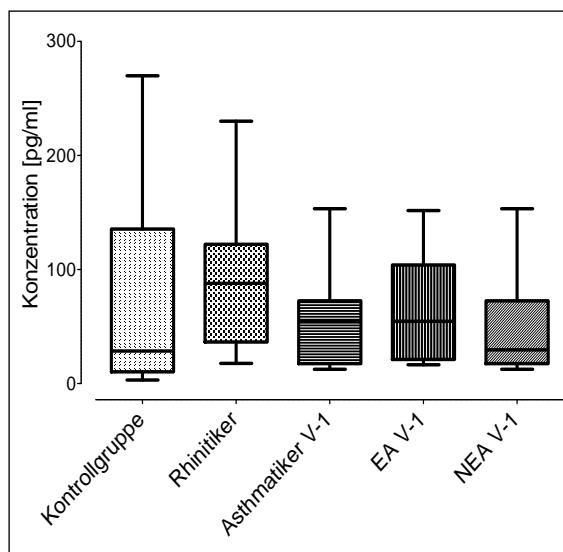


Abbildung 7: IL-6-Konzentration im Überstand der aktivierten CD3⁺ Zellen
Asthmatischer V-1 = EA V-1 und NEA V-1

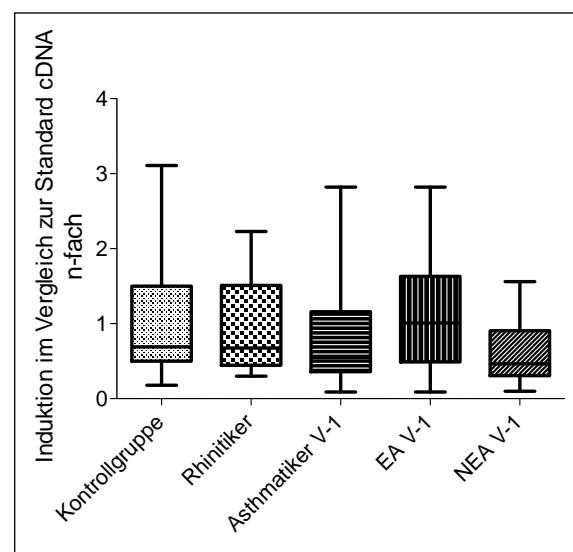
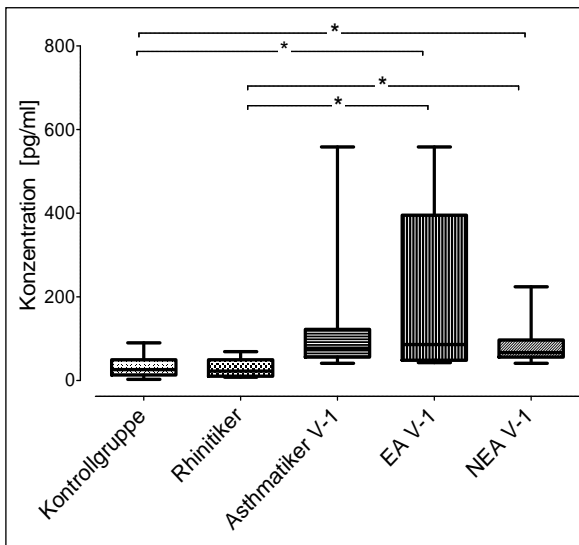


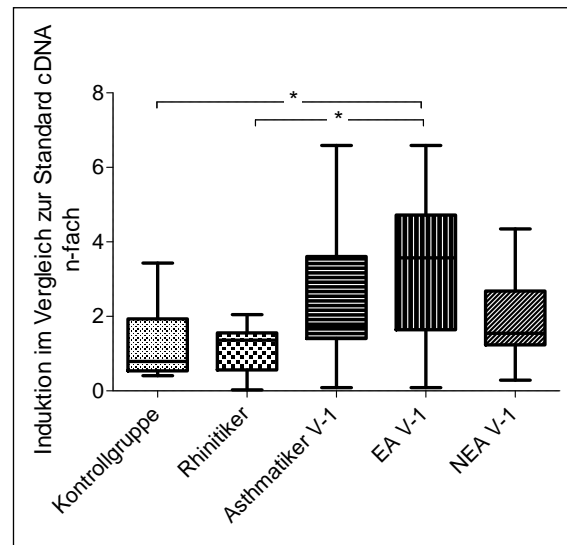
Abbildung 8: Quantitative Bestimmung der IL-6-RNA aktivierter CD3⁺ Zellen
Asthmatischer V-1 = EA V-1 und NEA V-1

Es konnte kein Unterschied im Überstand der aktivierten Zellen zwischen EA ($63,55 \pm 47,99$ pg/ml), NEA ($55,62 \pm 49,25$ pg/ml), Rhinitikern ($90,44 \pm 64,22$ pg/ml) und der Kontrollgruppe ($78,15 \pm 89,00$ pg/ml) detektiert werden ($p = 0,629$). Auch auf RNA-Ebene wurde kein signifikanter Unterschied gemessen ($p = 0,33$).

d) Interleukin 10



**Abbildung 9: IL-10-Konzentration im Überstand der aktivierten CD3⁺ Zellen; *p ≤ 0,05
Asthmatischer V-1 = EA V-1 und NEA V-1
ANOVA: p = 0,0007**



**Abbildung 10: Quantitative Bestimmung der IL-10-RNA aktivierter CD3⁺ Zellen *p ≤ 0,05
Asthmatischer V-1 = EA V-1 und NEA V-1
ANOVA: p = 0,016**

Proteinmessung im Überstand (Abbildung 9)

Die mittlere IL-10-Konzentration im Überstand betrug bei den Asthmatikern 128,8 pg/ml (SD = 145,3) in der Kontrollgruppe 34,88 ± 27,15 pg/ml und bei den Rhinitikern 28,99 ± 22,53 pg/ml. Die ANOVA zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen EA (186,1 ± 210,0 pg/ml), NEA (87,11 ± 50,96 pg/ml), Rhinitikern und der Kontrollgruppe (p = 0,0007). Zwischen Rhinitikern und Kontrollgruppe zeigte sich kein Unterschied (p = 1,00). EA und NEA waren gegenüber der Kontrollgruppe (p = 0,034 bzw. p = 0,035) und den Rhinitikern (p = 0,012 bzw. p = 0,013) signifikant, jedoch nicht untereinander (p = 1,00).

RNA-Quantifizierung (Abbildung 10)

Die mittleren RNA-Expressionslevel von beiden Asthmagruppen betrugen 2,40 ± 1,72, bei Rhinitikern 1,13 ± 0,63 und bei der Kontrollgruppe 1,29 ± 1,02. In der ANOVA zeigten sich analog zu der Proteinmessung signifikante Unterschiede zwischen EA, NEA, Rhinitikern und der Kontrollgruppe (p = 0,016). Rhinitiker und die Kontrollgruppe unterschieden sich nicht voneinander (p = 1,00).

EA ($3,16 \pm 2,16$) waren signifikant gegenüber Rhinitikern ($p = 0,018$) und der Kontrollgruppe ($p = 0,041$), NEA ($1,87 \pm 1,18$) zeigten keine Unterschiede gegenüber den Nichtasthmatikergruppen ($p = 1,00$). Unterschiede zwischen EA und NEA erreichten keine statistische Signifikanz ($p = 0,251$).

e) Interleukin 13

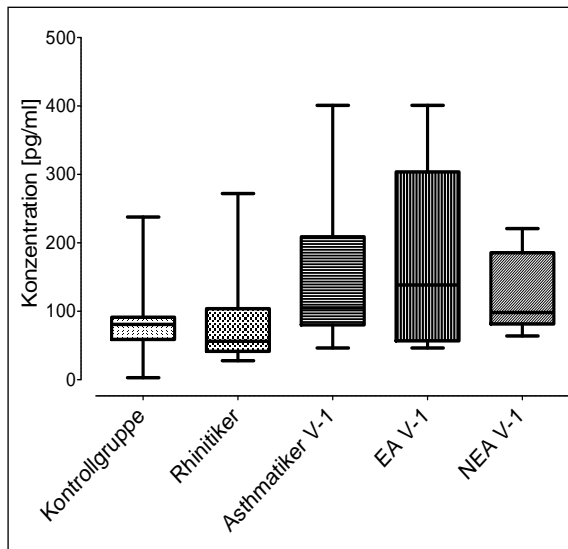


Abbildung 11: IL-13-Konzentration im Überstand der aktivierten CD3⁺ Zellen
Asthmatiker V-1 = EA V-1 und NEA V-1
ANOVA: $p = 0,067$

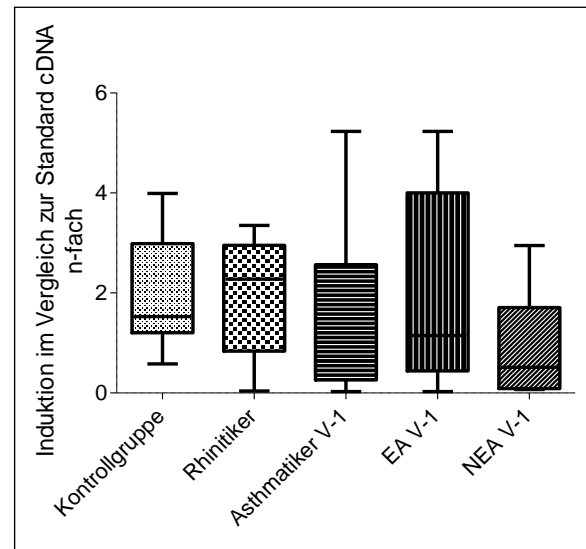


Abbildung 12: Quantitative Bestimmung der IL-13-RNA aktivierter CD3⁺ Zellen
Asthmatiker V-1 = EA V-1 und NEA V-1
ANOVA: $p = 0,147$

Proteinmessung im Überstand (Abbildung 11)

Die mittlere IL-13-Konzentration bei den Asthmatikern betrug $144,9 \text{ pg/ml}$ ($\text{SD} = 97,35$), bei den Rhinitikern $87,62 \pm 77,56 \text{ pg/ml}$ und bei der Kontrollgruppe $86,82 \pm 62,98 \text{ pg/ml}$. EA ($178,3 \pm 132,6 \text{ pg/ml}$) und NEA ($120,5 \pm 56,65 \text{ pg/ml}$) zeigten gegenüber der Kontrollgruppe und den Rhinitikern tendenziell eine erhöhte Expression des Proteins, signifikante Unterschiede ließen sich jedoch nicht detektieren ($p = 0,067$).

RNA-Quantifizierung (Abbildung 12)

Das Expressionslevel der mRNA zwischen EA ($2,16 \pm 2,01$), NEA ($0,90 \pm 0,99$), den Rhinitikern ($1,99 \pm 1,11$) und der Kontrollkohorte ($2,04 \pm 1,12$) zeigte sich nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,147$).

f) Interleukin 17A

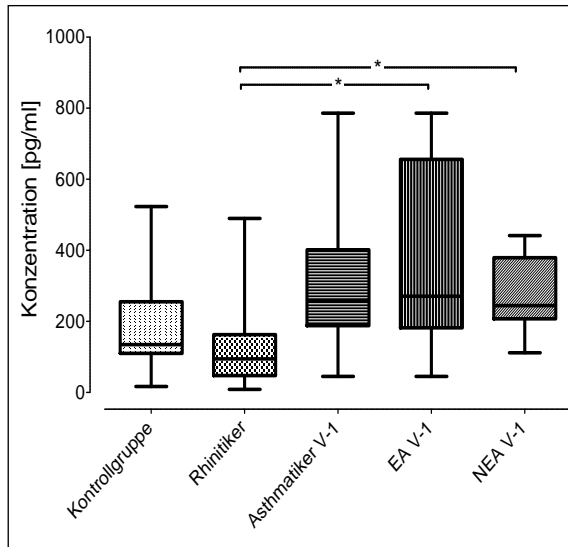


Abbildung 13: IL-17A-Konzentration im Überstand der aktivierten CD3⁺ Zellen; *p ≤ 0,05
Asthmatiker V-1 = EA V-1 und NEA V-1
ANOVA: p = 0,007

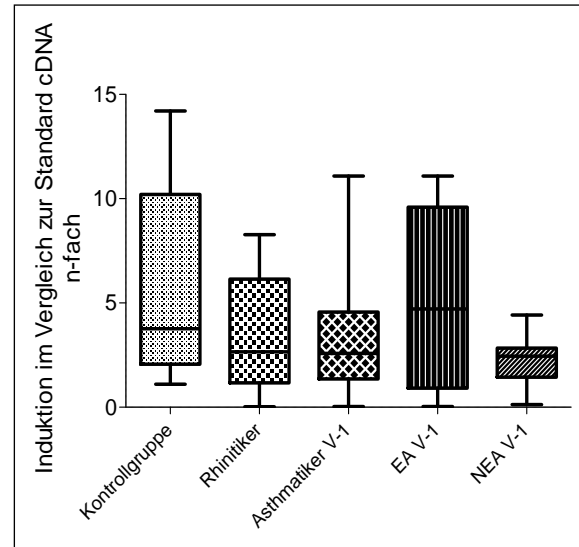


Abbildung 14: Quantitative Bestimmung der IL-17A-RNA aktivierter CD3⁺ Zellen
Asthmatiker V-1 = EA V-1 und NEA V-1
ANOVA: p = 0,343

Proteinmessung im Überstand (Abbildung 13)

Bei den Asthmatikern wurde eine mittlere Interleukin 17A-Konzentration von $313,6 \pm 191,3$ pg/ml gemessen, bei den Rhinitikern $130,5 \pm 135,7$ pg/ml und bei der Kontrollkohorte $185,9 \pm 156,6$ pg/ml. Die ANOVA zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten ($p = 0,007$). In der post-hoc Analyse waren Unterschiede zwischen Rhinitikern und EA ($373,4 \pm 268,5$ pg/ml) sowie NEA ($270,1 \pm 102,5$ pg/ml; $p = 0,025$ bzw. $p = 0,028$) signifikant. Nicht signifikant zeigten sich die Kontrollgruppe gegenüber EA und NEA ($p = 0,371$ bzw. $p = 0,48$), die Kontrollgruppe gegenüber den Rhinitikern ($p = 1,00$) und die beiden Asthmatikergruppen gegeneinander ($p = 1,00$).

RNA-Quantifizierung (Abbildung 14)

Zwischen EA ($4,94 \pm 4,2$), NEA ($2,23 \pm 1,51$), Rhinitikern ($3,36 \pm 2,79$) und der Kontrollgruppe ($5,7 \pm 4,9$) zeigten sich in der ANOVA keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,343$).

4.2.3.3 Zusammenfassung

In Übereinstimmung mit bisherigen Studien fand sich in unserer Studie eine erhöhte Expression der Interleukine 5 und 13 im Überstand aktivierter CD3⁺ Zellen von Asthmatikern gegenüber Gesunden und allergischen Rhinitikern. Der Unterschied war bei großer Varianz und vermutlich zu geringer Probandenzahl weder bei IL-5 noch bei IL-13 signifikant, eine Tendenz in die erwartete Richtung jedoch ersichtlich. Bei IL-17A und IL-10 konnte auf Proteinebene eine signifikant erhöhte Expression der Zytokine bei Asthmatikern nachgewiesen werden.

Auf RNA-Ebene konnte ebenfalls eine signifikant erhöhte Konzentration von IL-10-RNA bei Asthmatikern gegenüber den Nicht-Asthmatikern gezeigt werden. Interessanterweise fand sich sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene eine tendenziell geringere Expression von IL-10 bei NEA gegenüber EA. Signifikante Unterschiede zwischen EA und NEA fanden sich aber weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene. Die Ursachen für diese Ergebnisse werden nach dem folgenden Kapitel diskutiert.

4.3 Ergebnisse vor und nach 8-wöchiger Applikation von inhalativem Ciclesonid

Die beschriebenen Untersuchungen aus Visite -1 (siehe 3.1) wurden nach 8-wöchiger inhalativer Applikation von Ciclesonid erneut durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen. 2 NEA führten die Inhalation mit Ciclesonid nicht durch und wurden bei den molekularbiologischen Untersuchungen daher nicht berücksichtigt.

4.3.1 Lungenfunktion bei Visite 0 und Visite 1

Im Prä-Post Vergleich der Lungenfunktionstestungen erhöhte sich bei den EA signifikant die Abbruchsstufe bei der bronchialen Methacholinprovokation (Median der Abbruchsstufe in V-1: 3 vs. V1: 5; $p = 0,028$), außerdem zeigte sich bei Visite 1 im Vergleich zu Visite 0 bei NEA ein höherer bronchialer Widerstand ($V0: 122,1 \pm 47,7$ vs. $V1: 138,7 \pm 38,2$; $p = 0,032$). Das FEV_1 (% des Sollwertes) war gegenüber dem Ausgangswert erniedrigt, ohne allerdings statistische Signifikanz zu erreichen ($p = 0,067$). Alle anderen Variablen der beiden Kohorten zeigten keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf.

Die Ergebnisse der Lungenfunktion im zeitlichen Verlauf bei Visite 0 und Visite 1 sind in Tabelle 4 dargestellt.

Kohorte Variable	EA (V0) <i>n</i> =9	EA (V1) <i>n</i> =9	p-Wert	NEA (V0) <i>n</i> =11	NEA (V1) <i>n</i> =11	p-Wert
FEV ₁ , % des Sollwertes (SD)	87,4 (13,3)	88,1 (14)	0,300	90 (16)	85,7 (18,4)	0,067
TI, % (SD)	86,1 (12)	86,3 (10,4)	0,586	90,1 (11,5)	88,5 (16,6)	0,922
SR _{tot} , % (SD)	126 (46,9)	125 (33)	0,910	122 (47,7)	139 (38,2)	0,032
ΔFEV ₁ nach Bronchodilatator, % (SD)	10,5 (6,1)	-	-	9,2 (5,4)	-	0,628
Stufe des Abbruchs der Provokation (Median) *	3 (V -1)	5	0,0284	7 (V -1)	7	0,910
Provokation positiv *	-	8/9	-	-	8/10	

Tabelle 4: Lungenfunktion, Bronchospasmolyse und Methacholinprovokation bei Visite 0 und 1, vor und nach 8-wöchiger GC-Inhalation

* Bei einem Patienten (NEA) wurde keine bronchiale Provokation durchgeführt, da der sR_{tot} bereits vor Beginn der Provokation bei über 3 kPa \times s lag

4.3.2 Molekularbiologische Messungen

4.3.2.1 Prä-Postvergleich der Zytokinexpression aktivierter CD3⁺ Zellen

Bei Visite 1 wurden erneut die CD3⁺ Zellen der mit Ciclesonid behandelten Asthmatiker mittels CBA und quantitativer PCR auf Expression der oben genannten Zytokine (siehe 3.2.2) untersucht.

Bei 2 EA und 3 NEA Asthmatikern konnten aufgrund technischer Probleme weder Zytokinkonzentrationen im Überstand gemessen werden noch eine Quantifizierung der RNA durchgeführt werden. Es wurden also 7 EA Paare und 8 NEA Paare analysiert.

a) Interleukin 4

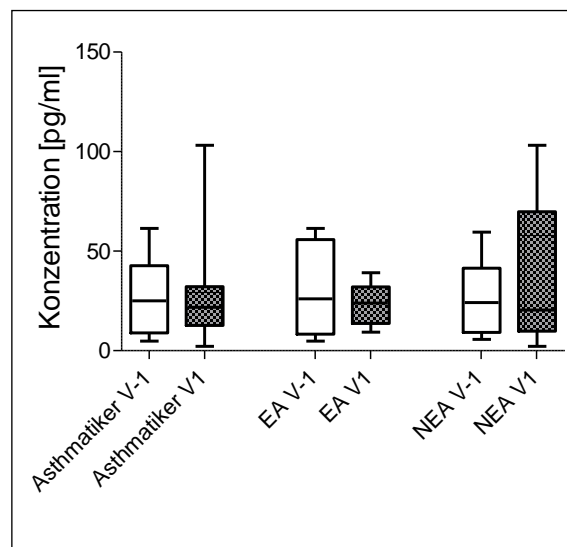


Abbildung 15: IL-4-Konzentration im Überstand der aktivierten CD3⁺ Zellen
Asthmatiker = EA und NEA

Bei IL-4 wurde nur die Zytokinexpression im Überstand gemessen, wobei keine signifikanten Unterschiede bei EA und NEA im zeitlichen Verlauf gezeigt werden konnten ($p = 0,469$ bzw. $p = 0,641$).

b) Interleukin 5

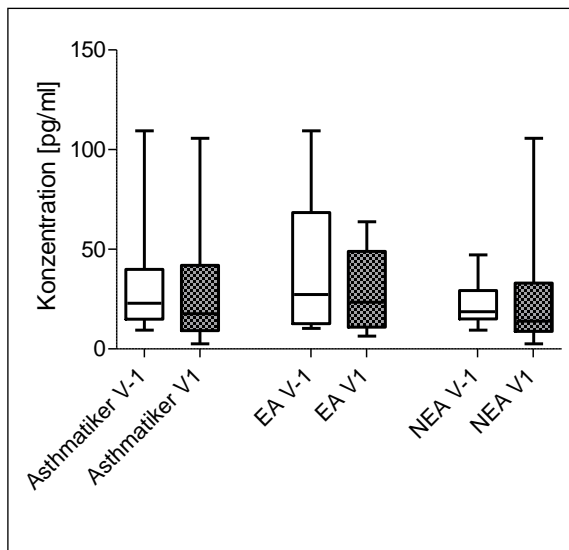


Abbildung 16: IL-5-Konzentration im Überstand der aktivierten CD3⁺ Zellen bei V-1 und V1 Asthmatischer = EA + NEA

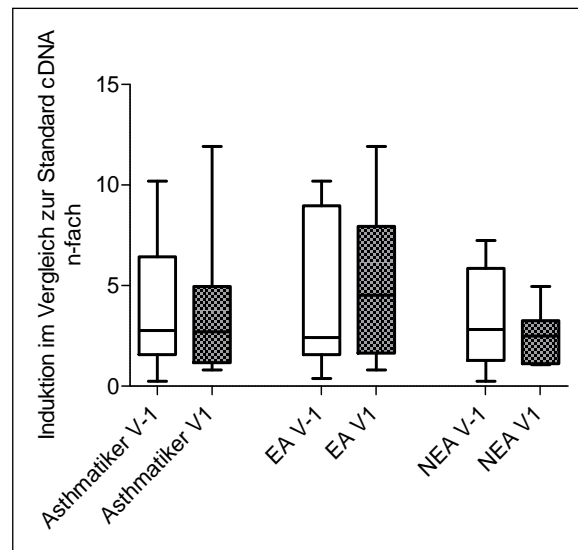


Abbildung 17: Quantitative Bestimmung der IL-5-RNA aktivierter CD3⁺ Zellen bei V-1 und V1 Asthmatischer = EA + NEA

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene eine signifikante Veränderung bei EA ($p = 0,148$ bzw. $p = 0,578$) und NEA ($p = 0,383$ bzw. $p = 0,313$). Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 16 und 17 dargestellt.

c) Interleukin 6

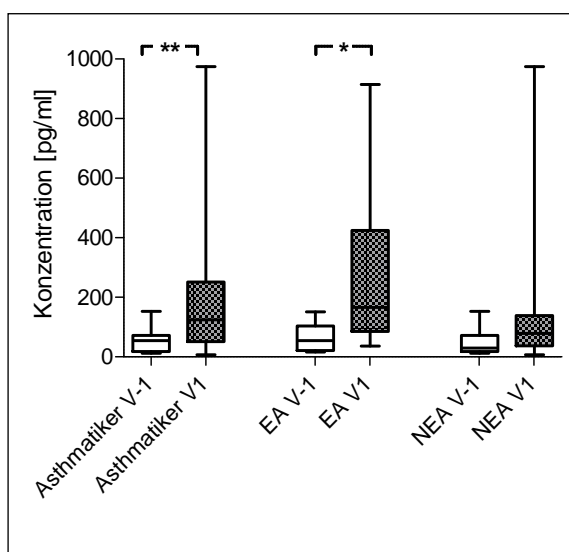


Abbildung 18: IL-6-Konzentration im Überstand der aktivierten CD3⁺ Zellen bei V-1 und V1 Asthmatischer = EA + NEA

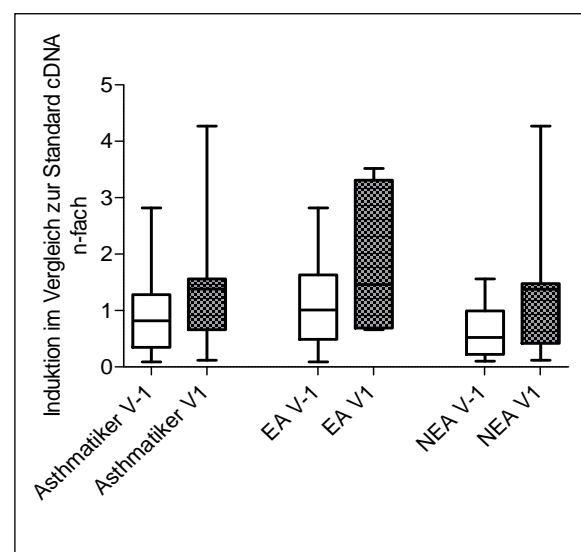


Abbildung 19: Quantitative Bestimmung der IL-6-RNA akt. CD3⁺ Zellen bei V-1 und V1 Asthmatischer = EA + NEA

Proteinmessung im Überstand (Abbildung 18)

Die mittlere IL-6-Konzentration im Überstand der EA bei V-1 betrug 64,55 pg/ml (SD = 47,99) und war signifikant niedriger als die mittlere Konzentration bei V1 ($279,0 \pm 285,8$; $p = 0,0156$), NEA zeigten auch bei V-1 eine niedrigere mittlere Zytokinkonzentration gegenüber V1, allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen ($55,62 \pm 49,25$ vs. $186,7 \pm 321,7$; $p = 0,3828$). Bei Betrachtung aller Asthmatiker war der Anstieg von V1 gegenüber V-1 sogar hochsignifikant (V-1: $58,96 \pm 47,53$ vs. $235,6 \pm 297,2$; $p = 0,009$). Die Proteinkonzentration stieg bei EA stärker an als bei NEA der Unterschied war jedoch nicht signifikant (EA: $230,7 \pm 303,4$ vs. NEA $103,1 \pm 330,1$; $p = 0,11$).

RNA-Quantifizierung (Abbildung 19)

Auf RNA-Ebene zeigten die Asthmatiker insgesamt im zeitlichen Verlauf ebenfalls eine erhöhte Expression von IL-6 ohne signifikant zu werden (V-1: $0,885 \pm 0,727$ vs. V1: $1,545 \pm 1,216$; $p = 0,0554$). EA ($1,163 \pm 0,887$ vs. $1,736 \pm 1,200$; $p = 0,375$) und NEA ($0,643 \pm 0,488$ vs. $1,378 \pm 1,286$; $p = 0,148$) wiesen jeweils eine ansteigende Expression der IL-6-RNA auf ohne dabei Signifikanz zu erreichen.

d) Interleukin 10

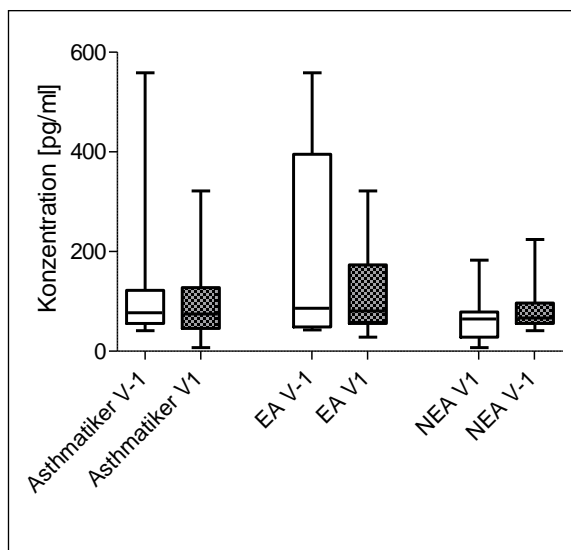


Abbildung 20: IL-10-Konzentration im Überstand der aktivierten CD3⁺ Zellen bei V-1 und V1
Asthmatiker = EA und NEA

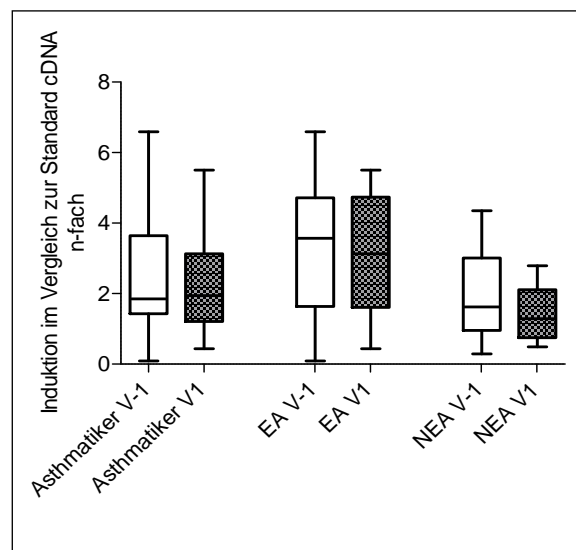


Abbildung 21: Quantitative Bestimmung der IL-10-RNA aktivierter CD3⁺ Zellen bei V-1 und V1
Asthmatiker = EA und NEA

Es konnte weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene ein signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf bei EA ($p = 0,313$ bzw. $p = 0,938$) und NEA ($p = 1,00$ bzw. $p = 0,547$) vor und nach Behandlung festgestellt werden (siehe Abbildungen 20 und 21).

e) Interleukin 13

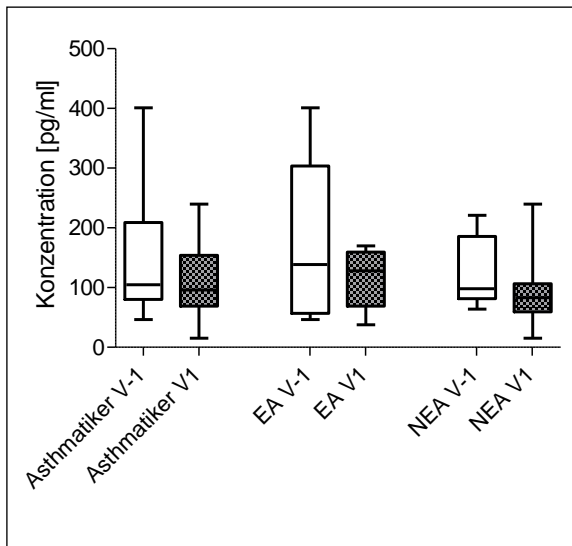


Abbildung 22: IL-13-Konzentration im Überstand der aktivierten $CD3^+$ Zellen bei V-1 und V1
Asthmatiker = EA + NEA

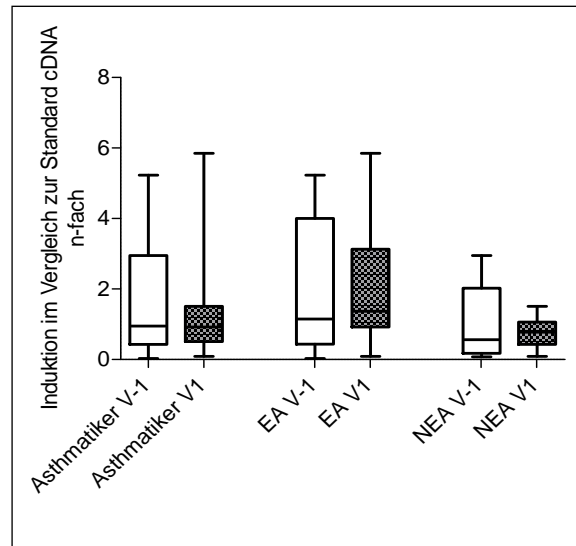


Abbildung 23: Quantitative Bestimmung der IL-13-RNA aktivierter $CD3^+$ Zellen bei V-1 und V1
Asthmatiker = EA + NEA

Auch bei der Expression von IL-13 fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Prä-Post-Analyse. Weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene gab es Unterschiede bei EA ($p = 0,109$ bzw. $p = 0,688$) und NEA ($p = 0,547$ bzw. $p = 0,844$). Die grafische Darstellung der Daten findet sich in Abbildung 22 und 23.

f) Interleukin 17A

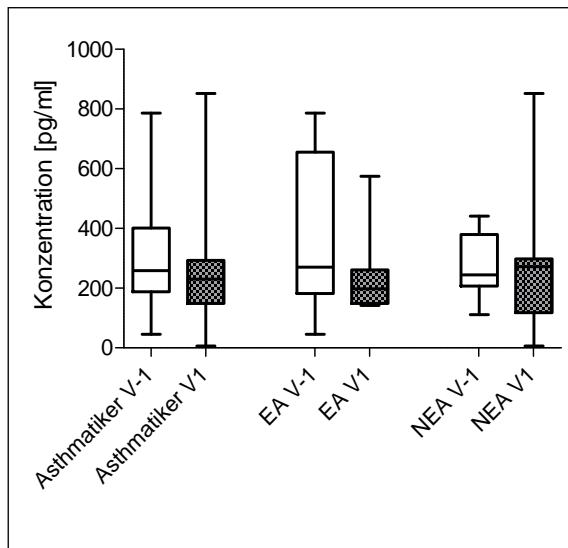


Abbildung 24: IL-17A-Konzentration im Überstand der aktivierten CD3⁺ Zellen bei V-1 und V1 Asthmatischer = EA + NEA

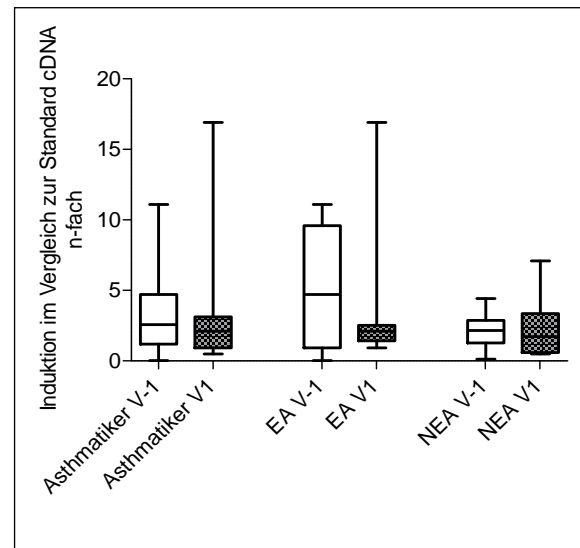


Abbildung 25: Quantitative Bestimmung der IL-17A-RNA aktivierter CD3⁺ Zellen bei V-1 und V1 Asthmatischer = EA + NEA

Bei der Expression von IL-17A ließen sich keine signifikanten Unterschiede auf Protein- und RNA-Ebene bei EA ($p = 0,078$ bzw. $p = 0,688$) und NEA ($p = 0,844$ bzw. $p = 0,844$) feststellen (siehe Abbildung 24 und 25).

4.3.2.2 Zusammenfassung

Die Untersuchungen zeigten im zeitlichen Verlauf bei IL-6 auf Proteinebene einen Expressionsanstieg, auf RNA-Ebene fand sich ebenfalls ein Anstieg, allerdings ohne dasselbe statistische Niveau zu erreichen. Der Anstieg der Zytokinexpression konnte insbesondere bei den EA nachgewiesen werden, bei den NEA zeigte sich kein signifikanter Anstieg von IL-6 nach Therapie. Alle anderen Zytokine zeigten keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf. Im folgenden Kapitel werden diese Ergebnisse nun diskutiert.

5 Diskussion

Nachdem Asthma bronchiale lange als weitgehend uniforme Erkrankung angesehen wurde, unterscheidet man heute zwischen verschiedenen Phänotypen bzw. Endotypen mit jeweils spezifischen Signalwegen. Aufgrund der beteiligten Effektorzellen der zugrunde liegenden bronchialen Entzündung kann man phänotypisch eosinophile (EA) und nicht-eosinophile Asthmatiker (NEA) differenzieren. Erste Studien weisen auf eine klinische Relevanz dieser Phänotypen hin: Insbesondere ein Teil der NEA leiden unter einem schweren, therapierefraktären Asthma und NEA sprechen insgesamt schlechter auf die Therapie mit ICS an.⁸⁷ Woodruff et al. konnten nachweisen, dass eine Therapie mit ICS bei einem T_H2-high-Endotyp zu einer Verbesserung der Lungenfunktion und Symptomatik führt, bei einem T_H2-low-Endotyp dagegen nicht.¹²⁶ Beim T_H2-high-Endotyp konnten in der BAL vermehrt eosinophile Granulozyten nachgewiesen werden.¹²⁶ Es liegt daher nahe, eine Verbindung zwischen phänotypisch eosinophilem Asthma und dem T_H2-high-Endotyp, bzw. analog zwischen dem nicht-eosinophilen Subtyp und T_H2-low-Endotyp zu vermuten.

Für die Entstehung des Inflammationsprozesses bei beiden Phänotypen und beim Asthma bronchiale im Allgemeinen werden unter anderem CD3⁺ T-Helferzellen und die von ihnen produzierten Zytokine verantwortlich gemacht. Vereinzelte Therapieerfolge scheinen diese Theorie zu bestätigen. Allerdings konnten die meisten klinischen Studien mit Medikamenten zur Blockierung von Zytokinwirkungen und mit gegen T-Zellen gerichteten Immunsuppressiva in der Praxis meistens nur enttäuschende Ergebnisse erzielen. Vermutlich ist die große pathogenetische Heterogenität von Asthma bronchiale für diese Beobachtung mitverantwortlich, unterschiedliche immunologische Prozesse führen zu den beobachteten Symptomen. Es wird postuliert, dass bei Identifikation der zugrundeliegenden Pathomechanismen und damit „wahrer Phänotypen“ (siehe 2.2.2) eine dem Patienten angepasste und effektivere Therapie möglich wäre. Eine Therapie mit Biologica entsprechend dem vorliegenden Phänotyp, und damit maßgeschneidert auf den Patienten, könnte dann signifikante Behandlungserfolge erbringen.

Aufgrund der aktuellen Erkenntnisse ist es naheliegend, eosinophile bronchiale Inflammation bzw. die Abwesenheit einer Eosinophilie als Ausdruck der unterschiedlichen pathogenetischen Mechanismen zu interpretieren. Wir haben hypothetisiert, dass sich deshalb bei den beiden Phänotypen das Expressionsprofil der Zytokine von CD3⁺ Lymphozyten unterscheiden würde. Auf Grundlage der dargelegten Forschungsergebnisse konnten wir weitere Hypothesen formulieren, die im Folgenden noch einmal kurz erläutert werden. Des Weiteren werden erneut die Ergebnisse unserer Studie zusammengefasst.

Hypothesen und Zusammenfassung der Ergebnisse

Eosinophilie gilt als Ausdruck einer gesteigerten T_H2-Immunität, zahlreiche Studien konnten die Bedeutung der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 in der Pathogenese eosinophiler Erkrankungen nachweisen. Auch die allergische Rhinitis wird als Erkrankung mit T_H2-Deviation bei atopischer Veranlagung gesehen. Wir erwarteten daher bei Patienten mit allergischer Rhinitis eine erhöhte Produktion der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13.

Manche Autoren sehen allergische Rhinitis und Asthma bronchiale als Ausprägungen der gleichen Erkrankung. Konsequenterweise könnte dies für eosinophiles Asthma zutreffen, nicht aber für nicht-eosinophiles Asthma. Unsere Hypothese war daher, dass unter anderem auf Grundlage der oben genannten Arbeit von Woodruff et al.¹²⁶ die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 auch bei EA gegenüber NEA und gegenüber Gesunden erhöht wären.

Demgegenüber wurde IL-17A und T_H17-Immunität in mehreren Studien als bedeutsam bei der Entwicklung von neutrophiler Entzündung und Steroidresistenz gesehen und könnte daher in der Pathogenese nicht-eosinophilen Asthmas eine Rolle spielen.^{78, 108} Es wurde des Weiteren gezeigt, dass IL-6 zusammen mit TGF-β die Differenzierung der T_H17-Zellen aus naiven T-Zellen induziert, IL-6 ist aber auch für die Differenzierung von T_H2-Zellen wichtig.^{37, 70}

Es sollte daher in unserer Studie geprüft werden, ob T-Zellen durch vermehrte IL-6-Produktion die T_H17 /Treg-Balance zugunsten von T_H17 beeinflussen und so IL-6 bei NEA vermehrt synthetisiert wird, bzw. ob die Lymphozyten von EA vermehrt IL-6 produzieren.

In der Ätiologie allergischer Krankheiten und auch im Rahmen von therapierefraktärem Asthma bronchiale wurde von einigen Autoren eine pathologisch erniedrigte oder defektive Expression von IL-10 als mögliche Ursache diskutiert und beobachtet; aber auch erhöhte IL-10-Sekretion wurde in einer Studie bei schweren Asthmatikern nachgewiesen, möglicherweise als Gegenregulationsmechanismus zu der vorliegenden Entzündungsaktivität.^{73, 81, 128} Insbesondere sollte hier geprüft werden, inwiefern sich die Expression von IL-10 bei EA und NEA unterscheidet.

Wir konnten die Interleukine IL-5 und IL-13 bei Asthmatikern nach Stimulation in erhöhter Konzentration im Überstand der $CD3^+$ T-Zellen nachweisen, diese Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant. Tendenziell zeigten sich bei EA höhere Konzentrationen als bei NEA, auch hier konnte aber keine Signifikanz gezeigt werden. IL-4 unterschied sich bei den Kohorten nicht. IL-10 und IL-17A konnten dagegen bei beiden Asthmatikergruppen in signifikant erhöhter Konzentration nachgewiesen werden, IL-17A allerdings nur auf Proteinebene. Zwischen den beiden Asthmatikergruppen (NEA/EA) konnte keine signifikant unterschiedliche Expression der untersuchten Zytokine nachgewiesen werden.

Zwischen Patienten mit allergischer Rhinitis und gesunden Kontrollprobanden wurde weder auf RNA- noch auf Proteinebene ein signifikanter Unterschied in der Expression der von uns gemessenen Zytokine gefunden.

Im Folgenden werden nun im Einzelnen die Ergebnisse unserer phänotypisierenden Untersuchungen und im Anschluss die Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen diskutiert.

Phänotypisierung

NEA in unserer Studie waren überwiegend dem paucigranulozytären Subtyp nach Simpson (siehe 2.2.4) zuzuordnen, diese Patienten wiesen im induzierten Sputum normwertige Granulozytenzahlen auf. Nur ein Patient wies einen neutrophilen Entzündungstyp auf und hob sich im Zellcount und bei mittelschwerer Symptomatik deutlich von den anderen Patienten ab. Patienten mit nicht-stabilem Phänotyp wurden ausgeschlossen. Haldar et al. wiesen in einem Review darauf hin, dass der paucigranulozytäre Subtyp mitunter bei gut kontrolliertem und intermittierendem Asthma gehäuft auftritt, laut aktuelleren Studien sind 30%-40% aller erwachsenen Asthmatiker dem paucigranulozytären Subtyp zuzuordnen.^{43, 50, 51, 107} Dies traf auch in der vorliegenden Studie zu, alle NEA mit paucigranulozytärem Sputum wiesen intermittierendes oder mildes Asthma auf. Bei den EA wiesen alle Patienten einen eosinophilen Subtyp auf, ein gemischt-granulozytärer Subtyp fand sich nicht.

Die demographischen Variablen und die nach Anamnese bestimmten Schweregrade des Asthmas unterschieden sich nicht signifikant zwischen den beiden Asthmatikerkohorten, wobei der Anteil intermittierenden Asthmas bei NEA deutlich höher war als bei EA (45,5% vs. 22%). In der Literatur wird eine Verbindung von Adipositas und nicht-eosinophilem Asthma diskutiert.¹¹⁶ In unserer Studie hatte jedoch kein NEA einen BMI >27 kg/m², für eine Aussage hierüber war die Fallzahl auch zu klein und das Studienkonzept nicht geeignet. Die Lungenfunktion der beiden Asthmatikerkohorten zeigte nicht-signifikant eine leicht höhere FEV₁ bei NEA gegenüber EA; die Methacholinreagibilität war bei EA signifikant höher als bei NEA. Aufgrund dieser Ergebnisse kann über eine etwas höhere Krankheitsaktivität bei EA spekuliert werden.

In Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur zeigen die klinischen Untersuchungen zur Phänotypisierung unserer Probanden ein heterogenes Bild der Phänotypen bei Asthma bronchiale auf. Die von Simpson beschriebenen Asthma-Subtypen (siehe 2.2.4), deren Klassifikation anhand der Granulozytenfraktionen im induzierten Sputum erfolgt, fanden sich mit Ausnahme des gemischt-granulozytären Subtyps auch in unserer Studie wieder. Aufgrund der Ausschlusskriterien und der Art der Patientenrekrutierung wurden jedoch hauptsächlich Patienten mit milderer Symptomatik rekrutiert.

Die Zusammenstellung der Subtypen liefert daher kein repräsentatives Bild für die unterschiedlichen Phänotypen von Asthma bronchiale. Haldar et al. fanden bei ihren Clusteranalysen (siehe auch 2.2.3) bei Patienten mit nicht-therapierefraktärem Asthma im ambulanten Rahmen fünf Cluster. Ein Asthmasubtyp zeigte geringe Entzündungsaktivität und wenig Symptomatik.⁵¹ Er wurde als benignes Asthma bezeichnet und könnte ein ähnliches Patientenkollektiv wie das paucigranulozytäre Asthma darstellen. Diesem Asthmasubtyp wäre in unserer Studie vermutlich ein Großteil der NEA zuzuordnen.

Ein weiteres von Haldar et al. gefundenes Cluster mit „obese-noneosinophilic asthma“ kam bei uns nicht vor. Aufgrund der eher milden Symptomatik und der Eosinophilie im Sputum könnte spekuliert werden, dass ein Teil unserer EA dem dritten Cluster „early onset atopic asthma“ oder eventuell dem vierten Cluster „inflammation predominant“ zugerechnet werden würde. Da wir keine Clusteranalyse durchführten, ist hierüber keine abschließende Entscheidung möglich.

Zytokinexpression in unstimulierten CD3⁺ T-Zellen

Bei der Analyse der RNA von unstimulierten Zellen konnte in der real time RT-PCR keine Zytokin-RNA nachgewiesen werden. Vermutlich war die Zahl der Matrizen für die Replikation zu gering und so unterschieden sich die in einer Probe gemessenen C_T-Werte zu stark um eine quantitative Aussage treffen zu können. Ein Grund könnte sein, dass unsere Methode der RNA-Isolation nicht genügend Matrizen-RNA isolieren konnte oder die RNA trotz sorgfältigen Arbeitens durch RNAsen degradiert wurde.

Möglich wäre auch, dass zu wenig RNA in den isolierten CD3⁺ T-Zellen gebildet wurde. Dies erscheint insbesondere vor dem Hintergrund realistisch, dass die meisten Patienten nur eine intermittierende oder milde Symptomatik aufwiesen und die Expression des HKG auch in den unstimulierten Zellen stets auf hohem Niveau und in ähnlichem Ausmaß wie bei stimulierten Zellen nachgewiesen werden konnte. Hansel et al. wiesen ebenfalls darauf hin, dass nur geringe Mengen Zytokin-RNA in zirkulierenden, unstimulierten T-Helferzellen vorhanden sind.

Die Arbeitsgruppe konnte aber mittels quantitativer PCR die RNA nachweisen, möglicherweise weil sie sich auf CD4⁺ T_H2-Zellen beschränkte, T-Zellen aus einer größeren Menge Blut isolierte und so eine relevante Anzahl Matrizen für die qPCR zur Verfügung hatte oder weil die untersuchten Patienten eine höhere Entzündungsaktivität aufwiesen.⁵² Um aus unstimulierten Zellen verwertbare Daten zu erhalten, wäre in unserer Studie möglicherweise eine Präamplifikation sinnvoll gewesen. Da wir jedoch davon ausgegangen waren, zumindest aus stimulierten Zellen genügend RNA für die Analyse zu erhalten, hatten wir uns im Rahmen der Studienplanung entschieden, auf diesen Schritt zu verzichten.

Im Folgenden werden daher die Ergebnisse der Zytokinexpression stimulierter T-Helferzellen diskutiert, wobei IL-4, 5 und 13 aufgrund der z.T. vorhandenen funktionellen Zusammengehörigkeit gemeinsam erörtert werden. Die Zytokinexpression von IL-6, IL-10, IL-17A sowie die Ergebnisse der Gruppe der allergischen Rhinitiker werden jeweils separat diskutiert.

Zytokinexpression bei allergischen Rhinitikern

Nach Stimulation von PBMCs, die aus peripherem Blut von AR gewonnen wurden, konnten Movérare et al. vermehrte Expression von T_H2-Zytokinen und von IL-10 im Überstand der Zellen nachweisen.⁹¹ Ciprandi et al. konnten in zwei weiteren Studien zum einen erhöhte IL-17A-Serumspiegel und vermehrt T_H17-Zellen im peripheren Blut bei allergischen Rhinitikern mit schwerer Birkenpollenallergie nachweisen.^{31, 32} Xuekun et al. fanden in ihrer Studie bei AR in peripherem Blut erhöhte T_H17- und $\gamma\delta$ T-Zellfraktionen und wie Ciprandi et al. im Serum erhöhte IL-17A-Konzentrationen; bei positiver Korrelation zwischen IL-17A und $\gamma\delta$ T-Zellen schlossen sie, dass am ehesten $\gamma\delta$ T-Zellen der Ursprung von IL-17A in diesem Patientenkollektiv darstellen. Sowohl Xuekun, Movérare als auch Ciprandi et al. führten die Blutentnahmen während der Pollensaison durch. Wosinska-Becler et al. wiesen darauf hin, dass eine erhöhte Zytokinexpression am ehesten am Ende der Pollensaison messbar ist, wenn im peripheren Blut eine erhöhte Anzahl sensibilisierter T-Zellen auftreten.¹²⁷ Bei AR konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Vergleich zur Kontrollkohorte keine signifikant abweichende Zytokinexpression nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den oben genannten Studien wurden bei uns zum einen AR zu jeder Jahreszeit eingeschlossen, zum anderen untersuchten wir die Zytokinexpression $CD3^+$ Zellen. Unser Ergebnis könnte also am ehesten mit einer geringeren Zahl an sensibilisierten T-Zellen im peripheren Blut zusammenhängen.

Alternativ könnten in den oben genannten Arbeiten von Xuekun, Movérare und Ciprandi et al. nicht- $CD3^+$ PBMCs oder andere Zellen Ursprung der nachgewiesenen Zytokine sein. Dies erscheint vor dem Hintergrund der bereits dargestellten Studienergebnisse jedoch eher unwahrscheinlich.

Expression der T_H2 -Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 bei eosinophilen und nicht-eosinophilen Asthmatikern

Die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 nehmen hinsichtlich der Steuerung des Immunsystems im Hinblick auf die Ausprägung von T_H2 -Immunität eine zentrale Rolle ein. Sie werden hauptsächlich von T-Zellen sezerniert und orchestrieren unter anderem die Differenzierung von T_H2 -Zellen, Induktion eines Immunglobulinklassenwechsels hin zu IgE, sowie die Chemotaxis und Differenzierung von eosinophilen Granulozyten (siehe 2.3.1).

In Kapitel 2.4 wurde bereits die Arbeit von Hansel et al. erwähnt, in der Studie wurde die Zytokinexpression $CD4^+$ T-Zellen nach Isolation aus peripherem Blut von Atopikern und Nicht-Atopikern mittels Microarrayanalyse verglichen. Ein Großteil der Probanden der Studie aus beiden Kohorten waren Asthmatiker. IL-4, IL-5 und IL-13 konnte in dieser Studie auf RNA-Ebene bei Atopikern erhöht nachgewiesen werden.⁵² Eine Vielzahl von weiteren Studien zeigte bereits den Zusammenhang zwischen Asthma bronchiale und der Expression dieser Zytokine, unter anderem konnte in bronchialen Biopsien, bronchoalveolärer Lavage (BAL) und im Serum von Asthmatikern die erhöhte Expression von IL-4, IL-5 und IL-13 festgestellt werden.^{30, 60, 68, 129}

Die Expression von IL-4 wurde in unserer Studie nur auf Proteinebene im Überstand mittels CBA nach Stimulation der $CD3^+$ T-Zellen untersucht, hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten nachgewiesen werden.

Ein positiver Prick-Test war bei uns, im Gegensatz zur Arbeit von Hansel et al., zwar kein Ausschlusskriterium für die Kontrollkohorte, doch auch nach Herausnahme der prickpositiven Kontrollen aus der statistischen Analyse konnte kein Unterschied in der Zytokinexpression festgestellt werden (Daten nicht dargestellt). Gründe für die abweichenden Ergebnisse und Unterschiede zwischen den beiden Arbeiten wurden zum Großteil im Unterkapitel „Zytokinexpression in unstimulierten CD3⁺ T-Zellen“ oben bereits ausgeführt. Zusätzlich ist noch zu erwähnen, dass Zytokinexpression auch posttranskriptionell reguliert wird, deshalb müssen Messungen auf RNA- und Proteinebene nicht zwangsläufig korrelieren. Bei IL-4 spielen gerade bei Asthma bronchiale unterschiedliche, posttranskriptionell regulierte Proteinvarianten mit unterschiedlicher Produktionskinetik eine Rolle.⁸² Zur fortgesetzten Erforschung der Funktion der einzelnen Varianten beim eosinophilen und nicht-eosinophilen Phänotyp müssten diese Varianten genauer betrachtet werden.

Bei der Messung von IL-5 fanden sich wie vermutet in unseren Analysen bei Asthmatikern erhöhte Proteinkonzentrationen im Überstand, die Unterschiede waren in der ANOVA signifikant. Die Zahl der Proben bzw. die gemessenen Unterschiede waren aber nicht groß genug um in der post-hoc Analyse einen Unterschied zwischen den Astmatikerkohorten und der Kontrollgruppe als signifikant zu bewerten. Die Ergebnisse der quantitativen PCR zeigten keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz zur CBA war die Probenzahl bei der qPCR geringer, weil bei einigen Proben die RNA-Ausbeute zu gering ausfiel und so keine qPCR durchgeführt werden konnte. Bei der Analyse von IL-5, und wie weiter unten aufgeführt auch von IL-13, konnten signifikante Unterschiede also auch nach Stimulation der CD3⁺ T-Zellen nicht in dem erwarteten und in der Studie von Hansel et al. auf RNA-Ebene bereits gezeigten Maß dargestellt werden. Neben den oben bereits genannten Unterschieden besteht eine weitere wichtige Abweichung von der vorliegenden Arbeit gegenüber der Studie von Hansel et al. darin, dass unsere Patienten auch gegenüber ICS seit 3 Monaten steroidnaiv sein mussten, was zu einem hohen Anteil von Patienten mit geringer Krankheitsaktivität und konsekutiv möglicherweise niedrigerer Zytokinexpression in unserer Studie führte.

Wegen der geringen Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen den Kohorten in unserer Studie hätte vermutlich eine größere Anzahl an Probanden eingeschlossen werden müssen, um signifikante Unterschiede in der Zytokinexpression zu ermitteln.

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich auf Proteinebene erhöhte IL-13-Konzentrationen im Überstand aktivierter CD3⁺ Zellen bei EA im Vergleich zu der Kontrollkohorte und den NEA. Auf RNA-Ebene fand sich bei EA eine höhere IL-13 Expression als bei NEA. Auch diese Daten erreichten – wie oben erwähnt vermutlich aufgrund der zu geringen Probandenzahl – keine statistische Signifikanz.

Trotzdem unterstützen sie mit Einschränkungen gemeinsam mit den Ergebnissen der IL-5-Expression die Hypothese, dass bei nicht-eosinophilem Asthma weniger eine T_H2-gewichtete Immunantwort im Vordergrund steht als bei Asthma mit eosinophiler Entzündung. Alternativ könnte bei den in unsere Studie eingeschlossenen NEA eine geringere Krankheitsaktivität vorliegen als bei den EA (siehe Unterpunkt „*Phänotypisierung*“) und deshalb eine geringere Zahl sensibilisierter T-Zellen mit niedrigerer Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-5 und 13 in der Peripherie zu finden sein.

Zusammenfassend konnten bei der Messung von IL-4 im Überstand aktivierter T-Lymphozyten zwischen den Kohorten kaum Unterschiede gezeigt werden. Bei EA war die Expression von IL-5 und IL-13 graduell stärker ausgeprägt als bei NEA und beide Kohorten produzierten tendenziell mehr von den beiden Zytokinen als die gesunde Kontrollkohorte. Insbesondere im Vergleich zwischen den Asthmatikerkohorten und den gesunden Kontrollen wäre jedoch zu erwarten gewesen, dass diese Unterschiede signifikant ausfallen. Mögliche Gründe für die geringen Unterschiede lagen u.a. in unserem strengen Konzept, das Patienten mit geringer Krankheitsaktivität in der Rekrutierung faktisch bevorzugte. Bei damit einhergehender, verringerter Expression von proinflammatorischen Zytokinen, hätte eine größere Zahl von Versuchspersonen möglicherweise zu Signifikanz geführt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zudem im Gegensatz zu vielen anderen Studien statt CD4⁺ T-Zellen CD3⁺ untersucht, unter der Annahme, dass möglicherweise nicht-CD4⁺ T-Zellreihen, wie z.B. NK T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen, im peripheren Blut vorhanden sind und zur Pathogenese von Asthma bronchiale beitragen.

Im pulmonalen Kompartiment wurde auf deren Bedeutung z.B. von Cho et al. bereits hingewiesen.²⁸ Aus den Ergebnissen unserer Arbeit kann nicht geschlossen werden, dass T_H2-Zytokine in relevanter Quantität von diesen Zellen beigetragen werden, bzw. die entsprechenden Zellen in der Peripherie überhaupt vorhanden sind. Für eine weitergehende Beurteilung dieser Fragestellung müssten diese Zellen aus peripherem Blut gesondert isoliert und betrachtet werden.

Angesichts der großen Varianz der Zytokinexpression, sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene innerhalb der Kohorten ist des Weiteren nicht auszuschließen, dass eine relevante Expression bei Patienten mit in unserer Kohortierung nicht berücksichtigtem Asthmasubtyp stattgefunden hat. In diesem Fall würde eine andere Klassifikation, z.B. nach endotypischen Gesichtspunkten, möglicherweise signifikante Unterschiede in der Zytokinexpression von T-Zellen aufzeigen können.

Diskussion der Zytokinexpression von IL-6

Im Blutserum von Asthmatikern konnten in bereits erfolgten Studien z.B. bei Yokoyama et al. erhöhte Spiegel von IL-6 nachgewiesen werden und Virchow et al. fanden insbesondere bei nicht-allergischen Asthmatikern erhöhte IL-6-Spiegel in der BAL; auch im induzierten Sputum fanden sich selbst bei milden Asthmatikern erhöhte IL-6-Spiegel.^{105, 119, 130} Bekannt ist des Weiteren, dass IL-6 einen wichtigen proinflammatorischen Botenstoff von Nichtimmunzellen darstellt, beispielsweise von Epithelzellen des Bronchialtraktes. Bei T-Zellen fand sich in bisherigen Arbeiten kein Hinweis für erhöhte Expression des Zytokins. Auch in unserer Studie fand sich kein Unterschied zwischen den Kohorten. Bisherige Erkenntnisse legen die Wichtigkeit von IL-6 für entzündliche Prozesse, sowie T_H2- und T_H17-Differenzierung nahe. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergaben jedoch keinen Anhalt für eine Bedeutung von IL-6 hinsichtlich der Differenzierung zwischen den Kohorten.

Diskussion der Zytokinexpression von IL-17A

Interleukin 17A wurde bereits mit mehreren chronisch-entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. IL-17A verursachte im Mausmodell die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Bronchien und vermittelte dort eine steroidresistente Entzündung.^{58, 88} Überdies scheint ein erhöhter Serumspiegel von IL-17A ein Risikofaktor für schweres Asthma zu sein und bei schweren Asthmatikern konnte in peripheren T_H-Zellen eine erhöhte Expression von IL-17A beobachtet werden.^{4, 52, 55, 95} Insgesamt ist die Funktion von T_H17 und IL-17A in der Pathogenese von Asthma bronchiale weiterhin nicht vollständig geklärt, immunmodulatorische und proinflammatorische Mechanismen kommen in unterschiedlichen Situationen zum Tragen.⁷⁹ Bislang wurde von den meisten Autoren T_H17-assoziiertes Asthma jedoch zumeist mit schwerem, neutrophilem Asthma in Verbindung gebracht, obwohl auch bei milden Asthmatikern schon erhöhte IL-17A-Spiegel in der BAL nachgewiesen wurden.⁷⁹ In der vorliegenden Studie, in der Patienten tendenziell ebenfalls eher von mildem Asthma betroffen waren, zeigten beide Asthmatikergruppen auf Proteinebene gegenüber den Kontrollen und den Rhinitikern erhöhte IL-17A-Konzentrationen, die Unterschiede erreichten jedoch nur gegenüber den Rhinitikern statistische Signifikanz. Auf RNA-Ebene zeigten sich dagegen keine Unterschiede zwischen den Kohorten. Möglicherweise erfüllt IL-17A auch in der Pathogenese von mildem, nicht-neutrophilem Asthma eine gewisse Funktion. In einer neueren Studie konnte in bronchialen Biopsien bei Asthmatikern mit unterschiedlichen Schweregraden ein T_H17-Endotyp identifiziert werden.²⁹ Spekulativ bleibt, ob dieser auch bei den Patienten mit erhöhter IL-17A-Expression aus der vorliegenden Arbeit endotypisch nachgewiesen werden könnte.

In einer weiteren Studie von Hashimoto et al. konnte bei atopischen Asthmatikern gegenüber nicht-atopischen Asthmatikern in T-Zellen nach Aktivierung und Zellexpansion eine erhöhte Expression von IL-17A auf Proteinebene gezeigt werden.⁵⁵ Atopie wurde in diesen Studien als positive Reaktion auf einen Prick-Test definiert.

Auch in unserer Studie wurde ein Prick-Test durchgeführt, hierbei wurde sowohl bei den meisten Asthmatikern, als auch bei den Rhinitikern und einem Teil der gesunden Kontrollprobanden ein positives Ansprechen dokumentiert. Wie oben dargelegt, zeigt sich jedoch nur bei den Asthmatikern eine erhöhte Expression von IL-17A. Demnach scheint die Produktion von IL-17A in der vorliegenden Studie weniger mit der Atopieneigung, als mit der Diagnose Asthma bronchiale an sich assoziiert. Der Unterschied in der Expression auf RNA -und Proteinebene ist möglicherweise durch posttranskriptionale Regulation der Proteinexpression und Stabilität der IL-17A-mRNA zu erklären.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass IL-17A als proinflammatorisches Zytokin mit regulatorischen Eigenschaften sowohl bei eosinophilem als auch bei nicht-eosinophilem Asthma eine Rolle spielt. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann daher nicht angenommen werden, dass IL-17A ausschließlich für die Ausprägung von nicht-eosinophilen Phänotypen wichtig wäre. Choy et al. diskutierten bereits, dass T_H2 - und T_H17 -Endotypen Überschneidungen aufweisen und bei manchen Patienten gleichzeitig auftreten.²⁹ Vermutlich konnten wir aus diesem Grund bei beiden Asthmatikerkohorten eine erhöhte IL-17A-Expression nachweisen.

Zytokinexpression von IL-10

Das Zytokin IL-10 nimmt eine wichtige Rolle in der Regulation und Begrenzung entzündlicher Prozesse ein. Dabei sind T_H -Lymphozyten nicht die wichtigste Quelle für IL-10 sondern am ehesten alternativ aktivierte Makrophagen. Regulatorische T-Zellen machen nur etwa 10% der IL-10-Produktion aus, könnten aber eine wichtige Verstärkerfunktion einnehmen und die IL-10-Sekretion bei alternativ aktivierten Makrophagen induzieren.^{24, 73}

In Bezug auf Asthma bronchiale ergeben sich in durchgeführten Studien verschiedene Aspekte. Sowohl eine verstärkte Expression des Zytokins in T-Zellen als auch eine Verminderung wurden bei verschiedenen Subtypen beschrieben.^{73, 76} In der BAL von Asthmatikern konnte im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden eine verringerte IL-10-Konzentration nachgewiesen werden, was am ehesten mit einer erniedrigten IL-10-Expression von alveolären Makrophagen bei diesen Patienten zusammenhängt.⁶⁵

Lim et al. beschrieben, dass bei Asthmatikern mit einem bestimmten Polymorphismus im Promotor-Gen von IL-10 eine erniedrigte Expression von IL-10 in PBMCs vorlag und diese Patienten zu schwererer Erkrankung neigen.⁷⁶

Lee et al. untersuchten in einer Studie, in die pädiatrische, nichtsteroidnaive Patienten mit unterschiedlichen Asthmaschweregraden eingeschlossen wurden, die Funktion regulatorischer T-Zellen. In der Studie wurden CD4⁺ T-Zellen aus peripherem Blut isoliert, der Anteil regulatorischer T-Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen und aus den unstimulierten Zellen die RNA extrahiert. Unter anderem wurde im Anschluss die IL-10-Expression auf RNA-Ebene untersucht. Bei Patienten mit milder Symptomatik konnte eine verminderte Zahl regulatorischer T-Zellen, aber eine erhöhte Expression von IL-10-mRNA festgestellt werden. Bei moderat-schweren Asthmatikern, die zum Teil unter systemischer Steroidtherapie standen, zeigte sich jedoch die T_{reg}-Zellzahl ähnlich hoch wie bei den gesunden Kontrollprobanden. Die IL-10-Expression der CD4⁺ T-Zellen zeigte sich sowohl gegenüber den gesunden Kontrollprobanden als auch gegenüber den milden Asthmatikern erhöht.⁷³ Auch Hartl et al. beschrieben eine quantitative Verringerung regulatorischer T-Zellen bei Kindern mit Asthma bronchiale, die Expression von IL-10 wurde hier jedoch nicht untersucht.⁵⁴ Hansel et al. fanden in der bereits erwähnten Studie bei Atopikern eine erhöhte IL-10-Expression gegenüber Nicht-Atopikern.⁵²

In weiteren Studien konnte ebenfalls eher eine erhöhte IL-10-Expression bei Asthmatikern gezeigt werden.⁸⁰ Es wurde bereits dargelegt, dass eine verminderte IL-10-Sekretion, bzw. defektive T_{reg}-Expansion vermutlich nicht bei allen Asthmatikern eine Rolle spielt, sondern bei einer Subpopulation von Asthmatikern, am ehesten bei schwerem, therapierefraktärem Asthma (siehe Kapitel 2.3.3).

In unserer Studie lag die Expression von IL-10 bei Asthmatikern und insbesondere bei EA höher als bei den Gesunden, dies konnte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene bestätigt werden. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der IL-10-Expression zwischen EA und NEA. Allerdings zeigten sich die IL-10-Spiegel auf RNA –und Proteinebene bei EA tendenziell höher als bei NEA.

Da in unserer Studie keine Differenzierung der peripheren T-Zellen in Zellsubtypen stattfand, wäre es nicht ausgeschlossen, dass trotz geringer T_{reg}-Zellzahl vermehrt IL-10 gebildet wurde. Unser Ergebnis deckt sich daher im Wesentlichen mit den oben erwähnten Arbeiten von Hartl et al. und Lee et al.

Die Ergebnisse unserer Studie legen die Vermutung nahe, dass regulatorische T-Zellen als Antwort auf die chronische Entzündung vermehrt zur Sekretion von IL-10 angeregt werden bzw. bei anderen CD3⁺ T-Zellen die IL-10-Expression induzieren. Passenderweise zeigte sich bei NEA eine niedrigere IL-10-Expression als bei EA, möglicherweise aufgrund der geringeren Krankheitsaktivität bei NEA.

Zusammenfassung

Unsere Ergebnisse konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen EA und NEA demonstrieren. Mögliche Gründe hierfür liegen zum einen in der geringen Fallzahl unserer Studienteilnehmer bei großer Heterogenität der Erkrankung und der untersuchten Lymphozyten. Zum anderen ist zu vermuten, dass T-Zellen im peripheren Blut in vermindertem Ausmaß an der Entzündung im pulmonalen Kompartiment beteiligt sind, gerade im entzündungsarmen Intervall. Daher könnte die Betrachtung einzelner, kritischer T-Zell-Subpopulationen sinnvoll sein.

Die Expression aller Zytokine außer IL-4 waren bei den NEA etwas geringer ausgeprägt als bei EA, allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Dies deuteten wir als Ausdruck der geringeren Entzündungsaktivität bei NEA. Dies lässt sich sowohl an den klinisch erhobenen Parametern als auch am induzierten Sputum ablesen, wo einige EA im Vergleich zu NEA erhöhte granulozytäre Zellcounts aufwiesen.

Unsere Ergebnisse stützen die Hypothese, dass IL-17A eine gewisse Rolle in der Pathogenese von Asthma bronchiale einnimmt, und das nicht nur beim neutrophilen Subtyp nach Simpson. Es konnte nicht gezeigt werden, bei welchen oder ob dies bei allen Subtypen der Fall ist. Zwischen EA und NEA scheint es bezüglich der Sekretion von IL-17A keine Unterschiede zu geben. Auf eine vermehrte Expression von IL-6 bei T-Zellen von NEA oder EA fanden sich ebenfalls keine Hinweise.

Die erhöhte IL-10-Expression werteten wir als Ausdruck der Gegenregulationsmaßnahmen des Immunsystems bei stattfindender chronischer Inflammation. Passend dazu konnte bei NEA eine tendenziell geringere Expression beobachtet werden.

In unserer Analyse der Expression der untersuchten Zytokine fanden sich bei Rhinitikern keine relevanten Unterschiede im Vergleich zu der Kontrollkohorte. Letztlich waren vermutlich in der Peripherie zu wenig sensibilisierte T-Zellen vorhanden, um einen messbaren Unterschied nachweisen zu können. Im Gegensatz zur Arbeit von Hansel et al. konnten in der vorliegenden Studie keine Hinweise auf eine verstärkte Expression von proinflammatorischen Zytokinen bei Atopikern im Vergleich zu Gesunden gefunden werden. Nach den Erkenntnissen aus unserer Arbeit ist die Differenzierung von Subtypen anhand des Zytokinexpressionsmusters von CD3⁺ T-Zellen peripheren Blutes eher ungeeignet. Problematisch ist hierbei einerseits über den Ansatz systemischer Regulation in der „Peripherie“ zu diskriminieren, andererseits die unspezifische Auswahl von CD3⁺ T-Zellen. Die gewählten Tools erscheinen nicht geeignet, zwischen NEA und EA zu unterscheiden, wobei offen bleiben muss, ob diese Unterscheidung tatsächlich, angesichts der großen Heterogenität ihres jeweiligen Phänotyps, eine immunologisch relevante Differenzierung der Erkrankung Asthma bronchiale ist. Möglicherweise handelt es sich bei dem Diskriminierungskriterium nur um ein Epiphänomen und nicht um immunologisch relevante, unterschiedliche Phänotypen.

Eine Differenzierung nach weiteren oder nach anderen Kriterien könnte weiterführend sein. Möglicherweise bietet die Analyse der durch Zytokine induzierten Gene eine Diskriminationsmöglichkeit zwischen unterschiedlichen Endotypen, oder eine Microarrayanalyse bzw. Next Generation Sequencing (siehe auch Kapiteln 2.2.2 und 2.3.1) kann hier weitere relevante Cluster oder Untergruppierungen identifizieren.

Zytokinexpression von Asthmatikern vor und nach der Therapie mit ICS

Da Glukokortikoide im Allgemeinen immunsuppressive Eigenschaften haben, wäre unter der Therapie eine verminderte Expression der proinflammatorischen Zytokine zu erwarten gewesen. IL-10 dagegen wird durch GCs induziert und könnte im Verlauf vermehrt exprimiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde therapeutisch Ciclesonid verordnet und über 8 Wochen appliziert. Bei Aufnahme der ICS in den systemischen Kreislauf wird es schnell in der Leber metabolisiert und soll überdies als Prodrug nur in der Lunge aktiviert werden; die orale Bioverfügbarkeit scheint zudem gering zu sein.^{66, 84, 114} Eine Veränderung der Zytokinexpression wäre daher eigentlich nur bei Wirkung der ICS auf die lokalen T-Zellen im pulmonalen Kompartiment und nennenswerter Migration dieser Zellen in den systemischen Blutkreislauf zu erwarten. Andererseits könnten ICS durch eine Veränderung der Inflammationssituation im Lungenkompartiment zu einer veränderten Zytokinexpression des gesamten Immunsystems führen.

Bei der Expression der Zytokine IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 und IL-17A zeigten sich keine signifikanten Unterschiede vor und nach der Therapie mit ICS. Nur bei IL-6 war bei der Analyse der Gesamtheit der Asthmatiker unter der Therapie auf Proteinebene ein signifikanter Anstieg nach Stimulation der CD3⁺ T-Zellen zu verzeichnen. Bei Betrachtung der einzelnen Kohorten zeigte sich auch bei den EA ein signifikanter Expressionsanstieg, nicht jedoch bei NEA. Bei zwei EA und einem NEA fiel der Anstieg um ein vielfaches höher aus als bei allen anderen Patienten. Der Unterschied zwischen den Kohorten zum Zeitpunkt V1 wies keine Signifikanz auf. Auch auf RNA-Ebene fand sich ein Anstieg im zeitlichen Verlauf, dieser erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Auf Proteinebene konnte unsere Arbeitsgruppe auch eine signifikante Steigerung der IL-1 β -Produktion bei allen Asthmatikern unter Therapie zeigen (Daten nicht dargestellt, $p = 0,01$). Bei bisher durchgeführten Studien zeigte sich zumeist eine Suppression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 unter lokaler Therapie mit GCs bei Asthmatikern und Rhinitikern, daher ist unser Ergebnis zunächst eher überraschend.^{33, 77}

Rüdiger et al. konnten beispielsweise zeigen, dass inhaliertes Budesonid nach 24 h zu einer Reduktion der Produktion von IL-6 und IL-1 β in stimulierten peripheren T-Lymphozyten führt; es ist daher anzunehmen, dass die immunsuppressive Wirkung von topischen Glukokortikoiden auch im peripheren Blut nachweisbar ist und somit Interaktionen zwischen Lungenkompartiment und peripheren T-Lymphozyten stattfinden oder die ICS z.B. durch teilweise orale Aufnahme doch systemische Wirkungen entfalten.¹⁰⁶

Ciprandi et al. zeigten, dass die Therapie über zwei Wochen mit topischem Budesonid in einer Studie mit allergischen Rhinitikern zu einer Reduktion der Zytokinexpression in nasalen Sekreten führte.³³ Auch in glatten Muskelzellen führen Glukokortikoide zu einer verminderten Expression von IL-6.¹⁰³ Im Gegensatz zu unserer Arbeit untersuchten diese und andere, bereits durchgeführte Studien die Zytokinexpression nach topischer Glukokortikoidtherapie von maximal zwei Wochen. Daher ist die Vergleichbarkeit sehr eingeschränkt, Glukokortikoide führen bei langfristiger Therapie zu Adaptationsprozessen und einer veränderten Zusammensetzung der Immunzellfraktionen in den verschiedenen Kompartimenten.⁹³ Desweiteren soll Ciclesonid als Prodrug, wie oben beschrieben, geringere systemische Wirkungen haben als das untersuchte Budesonid.⁸⁴

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die inhalative Therapie mit Ciclesonid über längere Zeit bei einem Teil der Patienten systemisch zu einem Expressionsanstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1 β in CD3⁺ T-Zellen führt.

Über die Ursachen dieses Ergebnisses muss spekuliert werden. Möglicherweise ist der Expressionsanstieg auf eine verminderte lokale Immunabwehr der behandelten Schleimhäute und daraus resultierende virale Infekte zurückzuführen. Patienten unter Ciclesonidtherapie leiden häufiger als gesunde Probanden unter Heiserkeit und Pharyngitis.²⁷ Klinisch und laborchemisch fanden sich zwar keine Infektzeichen, eine subklinische virale Affektion der Schleimhäute könnte trotzdem Ursache des Expressionsanstiegs von IL-6 sein. Gerade bei den drei Patienten mit den stark erhöhten Werten scheint diese Erklärung am plausibelsten.

Andererseits könnte die Ciclesonidtherapie, zu einer Veränderung der Lymphozytenzusammensetzung im peripheren Blut führen. T_H2-Zellen, die sensibel gegenüber GCs sind, könnten verschwinden, IL-6-produzierende Lymphozytensubpopulationen, wie z.B. T_H17-Zellen, übrigbleiben, beziehungsweise nach Wegfall der Gegenregulation durch T_H2-Zellen überexprimiert werden.⁹³ In unserer Studie zeigte sich bei den EA ein stärkerer Anstieg der IL-6-Expression als bei NEA. Auch wenn dieses Ergebnis statistisch keine Signifikanz aufwies, könnte es auf eine stärkere Suppression von T_H2-Zellen bei EA durch die inhalative Glukokortikoidtherapie hindeuten.

Um dieser Hypothese weiter nachzugehen, müssten die Lymphozytensubpopulationen bei den Kohorten zu den unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht werden, was im Rahmen dieser Studie nicht unternommen wurde.

Darüber hinaus wiesen andere Autoren, wie beispielsweise Anderson et al., bereits darauf hin, dass die Asthmatherapie mit ICS bei Erkrankungsbeginn die dauerhafte Deviation des Immunsystems hin zu T_H2-Immunität verstärken würde.^{6, 7} Dies scheint paradox vor dem Hintergrund der bereits erwähnten Suppression von T_H2-Zellen durch GCs. Glukokortikoidbedingt würde jedoch auch der IL-12-Rezeptor herunterreguliert, was langfristig zu einer erhöhten Produktion T_H2-assoziiierter Zytokine führen würde.⁶ Es wurde diskutiert, eine Behandlung mit ICS bei Beginn der Erkrankung könne daher zu einer Etablierung von Asthma bronchiale führen.⁷ IL-6 reguliert neben der Differenzierung von T_H17-Zellen auch die Differenzierung von T_H2-Zellen und könnte bei dauerhaft erhöhter Expression daher ebenfalls eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Krankheitsprozesse spielen.³⁷

Um die erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine in T-Lymphozyten unter Therapie mit ICS zu analysieren und ggf. einen Unterschied zwischen EA und NEA nachzuweisen, sind weitere umfangreichere Studien nötig.

Sollten sich diese Erkenntnisse bestätigen, würde dies die Notwendigkeit der Fortsetzung der Phänotypisierung und Findung von Richtlinien zur bedarfsgerechten Therapie von Asthma bronchiale weiter unterstreichen. Hierfür sprechen auch Studien wie die von Woodruff et al., die bereits zeigten, dass nicht alle Asthmatiker von der Therapie mit ICS profitieren.¹²⁶

Es besteht Hoffnung, dass in Zukunft durch die Aufdeckung „wahrer Phänotypen“ auch für diese Patientengruppen individualisierte und effektive Therapien gefunden werden können.

6 Literaturverzeichnis

1. *From the Global Strategy for Asthma Management and Prevention*, Global Initiative for Asthma (GINA) 2006, Available from: <http://www.ginasthma.org/>.
2. A plea to abandon asthma as a disease concept. *Lancet*. 2006;368(9537):705.
3. Afshar R, Medoff BD, Luster AD. Allergic asthma: a tale of many T cells. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(12):1847-1857.
4. Agache I, Ciobanu C, Agache C, Anghel M. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. *Respir Med*. 2010;104(8):1131-1137.
5. Alvarez MJ, Olaguibel JM, Garcia BE, Tabar AI, Urbiola E. Comparison of allergen-induced changes in bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation between mildly allergic asthma patients and allergic rhinitis patients. *Allergy*. 2000;55(6):531-539.
6. Anderson GP. Interactions between corticosteroids and beta-adrenergic agonists in asthma disease induction, progression, and exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(3 Pt 2):S188-196.
7. Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet*. 2008;372(9643):1107-1119.
8. Anderson P, Phillips K, Stoecklin G, Kedersha N. Post-transcriptional regulation of proinflammatory proteins. *J Leukoc Biol*. 2004;76(1):42-47.
9. Barnes PJ. Th2 cytokines and asthma: an introduction. *Respir Res*. 2001;2(2):64-65.
10. Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol*. 2006;148(3):245-254.
11. Barnes PJ. New therapies for asthma: is there any progress? *Trends Pharmacol Sci*. 2010;31(7):335-343.
12. Barnes PJ. Glucocorticosteroids: current and future directions. *Br J Pharmacol*. 2011;163(1):29-43.
13. Barnes PJ. Glucocorticosteroids. *Handb Exp Pharmacol*. 2016.
14. Barnes PJ, Greening AP, Crompton GK. Glucocorticoid resistance in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(6 Pt 2):S125-140.
15. Bateman ED, Boushey HA, Bousquet J, et al. Can guideline-defined asthma control be achieved? The Gaining Optimal Asthma Control study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(8):836-844.
16. Berry M, Morgan A, Shaw DE, et al. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma. *Thorax*. 2007;62(12):1043-1049.
17. Berry MA, Hargadon B, Shelley M, et al. Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N Engl J Med*. 2006;354(7):697-708.
18. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441(7090):235-238.
19. Bodey KJ, Semper AE, Redington AE, et al. Cytokine profiles of BAL T cells and T-cell clones obtained from human asthmatic airways after local allergen challenge. *Allergy*. 1999;54(10):1083-1093.
20. Bootman JL, Crown WH, Luskin AT. Clinical and economic effects of suboptimally controlled asthma. *Manag Care Interface*. 2004;17(1):31-36.
21. Bousquet J, Bousquet PJ, Godard P, Daures JP. The public health implications of asthma. *Bull World Health Organ*. 2005;83(7):548-554.

22. Braunstahl GJ. United airways concept: what does it teach us about systemic inflammation in airways disease? *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6(8):652-654.
23. Bullens DM, Truyen E, Coteur L, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res*. 2006;7:135.
24. Byers DE, Holtzman MJ. Alternatively activated macrophages and airway disease. *Chest*. 2011;140(3):768-774.
25. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol*. 2000;30(6):1538-1543.
26. Chanez P, Wenzel SE, Anderson GP, et al. Severe asthma in adults: what are the important questions? *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(6):1337-1348.
27. Chapman KR, Patel P, D'Urzo AD, et al. Maintenance of asthma control by once-daily inhaled ciclesonide in adults with persistent asthma. *Allergy*. 2005;60(3):330-337.
28. Cho SH, Stanciu LA, Holgate ST, Johnston SL. Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(3):224-230.
29. Choy DF, Hart KM, Borthwick LA, et al. TH2 and TH17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma. *Sci Transl Med*. 2015;7(301):301ra129.
30. Choy DF, Modrek B, Abbas AR, et al. Gene expression patterns of Th2 inflammation and intercellular communication in asthmatic airways. *J Immunol*. 2011;186(3):1861-1869.
31. Ciprandi G, De Amici M, Murdaca G, et al. Serum interleukin-17 levels are related to clinical severity in allergic rhinitis. *Allergy*. 2009;64(9):1375-1378.
32. Ciprandi G, Filaci G, Battaglia F, Fenoglio D. Peripheral Th-17 cells in allergic rhinitis: New evidence. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(2):226-229.
33. Ciprandi G, Tosca MA, Cirillo I, Vizzaccaro A. The effect of budesonide on the cytokine pattern in patients with perennial allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003;91(5):467-471.
34. Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N Engl J Med*. 2011;365(12):1088-1098.
35. Corrigan CJ, Kay AB. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol Today*. 1992;13(12):501-507.
36. Corry DB, Folkesson HG, Warnock ML, et al. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J Exp Med*. 1996;183(1):109-117.
37. Dienz O, Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clin Immunol*. 2009;130(1):27-33.
38. Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax*. 2002;57(7):643-648.
39. Fahy JV, Kim KW, Liu J, Boushey HA. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;95(4):843-852.
40. Finkelman FD, Hogan SP, Hershey GK, Rothenberg ME, Wills-Karp M. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J Immunol*. 2010;184(4):1663-1674.
41. Fleming L, Tsartsali L, Wilson N, Regamey N, Bush A. Sputum inflammatory phenotypes are not stable in children with asthma. *Thorax*. 2012;67(8):675-681.
42. Flood-Page P, Swenson C, Faierman I, et al. A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(11):1062-1071.
43. Gibson PG. Inflammatory phenotypes in adult asthma: clinical applications. *Clin Respir J*. 2009;3(4):198-206.

44. Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest*. 2001;119(5):1329-1336.
45. Gonzalez H, Khademi M, Borg K, Olsson T. Intravenous immunoglobulin treatment of the post-polio syndrome: sustained effects on quality of life variables and cytokine expression after one year follow up. *J Neuroinflammation*. 2012;9:167.
46. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010;32(5):593-604.
47. Green RH, Brightling CE, McKenna S, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360(9347):1715-1721.
48. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*. 2002;57(10):875-879.
49. Green RH, Pavord I. Stability of inflammatory phenotypes in asthma. *Thorax*. 2012;67(8):665-667.
50. Haldar P, Pavord ID. Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(5):1043-1052; quiz 1053-1044.
51. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(3):218-224.
52. Hansel NN, Cheadle C, Diette GB, et al. Analysis of CD4+ T-cell gene expression in allergic subjects using two different microarray platforms. *Allergy*. 2008;63(3):366-369.
53. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1123-1132.
54. Hartl D, Koller B, Mehlhorn AT, et al. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(5):1258-1266.
55. Hashimoto T, Akiyama K, Kobayashi N, Mori A. Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005;137 Suppl 1:51-54.
56. Hastie AT, Moore WC, Meyers DA, et al. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(5):1028-1036.e1013.
57. He R, Oyoshi MK, Jin H, Geha RS. Epicutaneous antigen exposure induces a Th17 response that drives airway inflammation after inhalation challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(40):15817-15822.
58. Hellings PW, Kasran A, Liu Z, et al. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(1):42-50.
59. Hew M, Bhavsar P, Torrego A, et al. Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(2):134-141.
60. Humbert M, Durham SR, Ying S, et al. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(5):1497-1504.
61. Islam SA, Luster AD. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med*. 2012;18(5):705-715.
62. Ito K, Chung KF, Adcock IM. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(3):522-543.

63. Ito K, Yamamura S, Essilfie-Quaye S, et al. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J Exp Med*. 2006;203(1):7-13.
64. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(5 Pt 1):1532-1539.
65. John M, Lim S, Seybold J, et al. Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1alpha, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(1):256-262.
66. Kawayama T, O'Byrne PM, Watson RM, et al. Effects of inhaled ciclesonide on circulating T-helper type 1/T-helper type 2 cells in atopic asthmatics after allergen challenge. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(11):1417-1424.
67. Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med*. 2005;202(11):1539-1547.
68. Kim CK, Kim SW, Park CS, Kim BI, Kang H, Koh YY. Bronchoalveolar lavage cytokine profiles in acute asthma and acute bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(1):64-71.
69. Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2010;11(7):577-584.
70. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*. 2010;40(7):1830-1835.
71. Kramer S, Rottier BL, Scholten RJ, Boluyt N. Ciclesonide versus other inhaled corticosteroids for chronic asthma in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;2:CD010352.
72. Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*. 2000;356(9248):2144-2148.
73. Lee JH, Yu HH, Wang LC, Yang YH, Lin YT, Chiang BL. The levels of CD4+CD25+ regulatory T cells in paediatric patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Clin Exp Immunol*. 2007;148(1):53-63.
74. Lemanske RF, Busse WW. 6. Asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2 Suppl):S502-519.
75. Leung DY, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(1):3-22; quiz 23.
76. Lim S, Crawley E, Woo P, Barnes PJ. Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma. *Lancet*. 1998;352(9122):113.
77. Linden M, Brattsand R. Effects of a corticosteroid, budesonide, on alveolar macrophage and blood monocyte secretion of cytokines: differential sensitivity of GM-CSF, IL-1 beta, and IL-6. *Pulm Pharmacol*. 1994;7(1):43-47.
78. Lindén A, Adachi M. Neutrophilic airway inflammation and IL-17. *Allergy*. 2002;57(9):769-775.
79. Lindén A, Dahlén B. Interleukin-17 cytokine signalling in patients with asthma. *Eur Respir J*. 2014;44(5):1319-1331.
80. Lloyd CM, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in asthma. *Immunity*. 2009;31(3):438-449.
81. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):838-848.

82. Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GA, Shea-Donohue T, Atamas SP. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". *J Leukoc Biol.* 2012;92(4):753-764.
83. Mamessier E, Nieves A, Lorec AM, et al. T-cell activation during exacerbations: a longitudinal study in refractory asthma. *Allergy.* 2008;63(9):1202-1210.
84. Manning P, Gibson PG, Lasserson TJ. Ciclesonide versus other inhaled steroids for chronic asthma in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008(2):CD007031.
85. Martin PE, Matheson MC, Gurrin L, et al. Childhood eczema and rhinitis predict atopic but not nonatopic adult asthma: a prospective cohort study over 4 decades. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(6):1473-1479.e1471.
86. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R, Program GfAG. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy.* 2004;59(5):469-478.
87. McGrath KW, Icitovic N, Boushey HA, et al. A large subgroup of mild-to-moderate asthma is persistently noneosinophilic. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(6):612-619.
88. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol.* 2008;181(6):4089-4097.
89. Miller SM, Ortega VE. Pharmacogenetics and the Development of Personalized Approaches for Combination Therapy in Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013.
90. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181(4):315-323.
91. Movérare R, Elfman L, Stålenheim G, Björnsson E. Study of the Th1/Th2 balance, including IL-10 production, in cultures of peripheral blood mononuclear cells from birch-pollen-allergic patients. *Allergy.* 2000;55(2):171-175.
92. Murdoch JR, Lloyd CM. Resolution of allergic airway inflammation and airway hyperreactivity is mediated by IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(4):464-476.
93. Nagano Y, Kondo M, Tamaoki J, Isono K, Nagai A. Peripheral blood Th1 and Th2 profile in patients with moderate asthma: effect of inhaled corticosteroid. *J Asthma.* 2002;39(3):247-253.
94. Nagata Y, Kamijuku H, Taniguchi M, Ziegler S, Seino K. Differential role of thymic stromal lymphopoietin in the induction of airway hyperreactivity and Th2 immune response in antigen-induced asthma with respect to natural killer T cell function. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;144(4):305-314.
95. Nanzer AM, Chambers ES, Ryanna K, et al. Enhanced production of IL-17A in patients with severe asthma is inhibited by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 in a glucocorticoid-independent fashion. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(2):297-304.e293.
96. O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol Rev.* 2008;223:114-131.
97. Pavord ID. Non-eosinophilic asthma and the innate immune response. *Thorax.* 2007;62(3):193-194.
98. Pavord ID, Pizzichini MM, Pizzichini E, Hargreave FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax.* 1997;52(6):498-501.
99. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax.* 1992;47(1):25-29.

100. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(2 Pt 1):308-317.
101. Porsbjerg C, Lund TK, Pedersen L, Backer V. Inflammatory subtypes in asthma are related to airway hyperresponsiveness to mannitol and exhaled NO. *J Asthma*. 2009;46(6):606-612.
102. Qin Q, Liu P, Liu L, et al. The increased but non-predominant expression of Th17- and Th1-specific cytokines in Hashimoto's thyroiditis but not in Graves' disease. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45(12):1202-1208.
103. Quante T, Ng YC, Ramsay EE, et al. Corticosteroids reduce IL-6 in ASM cells via up-regulation of MKP-1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;39(2):208-217.
104. RACKEMANN FM. A working classification of asthma. *Am J Med*. 1947;3(5):601-606.
105. Rincon M, Irvin CG. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1281-1290.
106. Rüdiger JJ, Gencay M, Yang JQ, Bihl M, Tamm M, Roth M. Fast beneficial systemic anti-inflammatory effects of inhaled budesonide and formoterol on circulating lymphocytes in asthma. *Respirology*. 2013;18(5):840-847.
107. Schleich FN, Manise M, Sele J, Henket M, Seidel L, Louis R. Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation. *BMC Pulm Med*. 2013;13:11.
108. Schmidt-Weber CB, Akdis M, Akdis CA. TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(2):247-254.
109. Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med*. 2006;203(12):2715-2725.
110. Simpson JL, Grissell TV, Douwes J, Scott RJ, Boyle MJ, Gibson PG. Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis. *Thorax*. 2007;62(3):211-218.
111. Simpson JL, Powell H, Boyle MJ, Scott RJ, Gibson PG. Clarithromycin targets neutrophilic airway inflammation in refractory asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(2):148-155.
112. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology*. 2006;11(1):54-61.
113. Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Osada T, Febbraio MA, Pedersen BK. IL-6 and TNF- α expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283(6):E1272-1278.
114. Stoeck M, Riedel R, Hochhaus G, et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory activity of the new glucocorticoid ciclesonide. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;309(1):249-258.
115. Strickland DH, Stumbles PA, Zosky GR, et al. Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med*. 2006;203(12):2649-2660.
116. Telenga ED, Tideman SW, Kerstjens HA, et al. Obesity in asthma: more neutrophilic inflammation as a possible explanation for a reduced treatment response. *Allergy*. 2012;67(8):1060-1068.
117. To T, Stanojevic S, Moores G, et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*. 2012;12:204.
118. Vanaudenaerde BM, Wuyts WA, Geudens N, et al. Macrolides inhibit IL17-induced IL8 and 8-isoprostane release from human airway smooth muscle cells. *Am J Transplant*. 2007;7(1):76-82.
119. Virchow JC, Kroegel C, Walker C, Matthys H. Inflammatory determinants of asthma severity: mediator and cellular changes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98(5 Pt 2):S27-33; discussion S33-40.

120. Wardlaw AJ, Brightling C, Green R, Woltmann G, Pavord I. Eosinophils in asthma and other allergic diseases. *Br Med Bull.* 2000;56(4):985-1003.
121. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med.* 2012;18(5):716-725.
122. Wenzel SE, Busse WW, National Heart Ln, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Severe asthma: lessons from the Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(1):14-21; quiz 22-13.
123. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(3):1001-1008.
124. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science.* 1998;282(5397):2258-2261.
125. Wilson RH, Whitehead GS, Nakano H, Free ME, Kolls JK, Cook DN. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(8):720-730.
126. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(5):388-395.
127. Wosinska-Becler K, Plewako H, Håkansson L, Rak S. Cytokine production in peripheral blood cells during and outside the pollen season in birch-allergic patients and non-allergic controls. *Clin Exp Allergy.* 2004;34(1):123-130.
128. Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, et al. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest.* 2006;116(1):146-155.
129. Ying S, Durham SR, Corrigan CJ, Hamid Q, Kay AB. Phenotype of cells expressing mRNA for TH2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and TH1-type (interleukin 2 and interferon gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;12(5):477-487.
130. Yokoyama A, Kohno N, Fujino S, et al. Circulating interleukin-6 levels in patients with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151(5):1354-1358.
131. Zhang DH, Yang L, Cohn L, et al. Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity.* 1999;11(4):473-482.
132. Zijlstra GJ, Ten Hacken NH, Hoffmann RF, van Oosterhout AJ, Heijink IH. Interleukin-17A induces glucocorticoid insensitivity in human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J.* 2012;39(2):439-445.

7 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Frau PD Dr. Seifart für die Bereitstellung des Themas und die konstante Betreuung bedanken.

Ich danke meinem Vater, der mich während des Studiums unterstützt hat und ohne den diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gilt Christian Michel, der mich bei der Methodik unterstützt hat und dafür viel Zeit geopfert hat. Auch Frau Dr. Hagner-Benes möchte ich sehr herzlich danken für die Unterstützung bei Durchführung, Auswertung und Interpretation der PCR und Prof. Dr. Garn für die fruchtbare Diskussion hinsichtlich der Interpretation der Ergebnisse.

Dank gilt auch Akira Hattesoht, der mir bei IT- und Statistikfragen mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich danke Thomas Damm, Viktor Kotke, Ursula Boas und Gisela Hofmann, sowie dem gesamten Team des Alpha-1-Antitrypsin Zentrums für die stete Unterstützung sowie das angenehme Arbeitsklima.

Des Weiteren danke ich Alexander Neben für seine Hilfe bei der graphischen Gestaltung.

Zuletzt danke ich meiner Frau für ihre Liebe, moralische Unterstützung, die vielen Stunden Korrekturlesen und konstruktive Kritik.

8 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg und Kassel waren die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Arabin, Aumüller, Bals, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Berger, Bette, Bien, Bliemel, Bücking, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Dietz, Dodel, Donner-Banzhoff, Eilers, El-Zayat, Eming, Engenhardt-Cabillic, Fendrich, Feuser, Figiel, Fuchs-Winkelmann, Geks, Görg, Greulich, Gress, Grundmann, Häußermann, Hertl, Hillejan, Höffken, Hofmann, Höpfner, Hoyer, Hummel, Hundt, Jerrentrup, Kalder, Kann, Kanngießer, Karakas, Kill, Kim-Berger, Kircher, Kirschbaum, Klingmüller, Klose, Knorrenschild, Koczulla, König, Koolman, Krüger, Kruse, Kühne, Leonhardt, Lill, Löffler, Lohoff, Löser, Maier, Maisch, Mandic, Mandrek, Mann, Meyer, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Plant, Printz, Ramaswamy, Renz, Richter, Röhm, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schierl, Schmidt, Schoner, Seifart, Sekundo, Sevinc, Schofer, Seitz, Sesterhenn, Sommer, Steiniger, Tackenberg, Teymoortash, Vogelmeier, Voigt, Wack, Wagner, Waldmann, Weiss, Weihe, Werner, Westermann, Wulf, Zemlin, Zettl, Ziring, Zovko.